

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Aislamiento de *Bartonella henselae* en líneas
celulares por el método de Shell Vial**

TESIS

**Para optar al Título Profesional de Bióloga con mención en
Microbiología y Parasitología**

AUTOR

Norma Olimpia Tarazona Acero

Lima – Perú

2015

*Con inmenso amor,
a mis seres queridos,
por su invalorable apoyo.
A la vida,
que me permite
mirar lo andado.*

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento especial a las autoridades del Instituto Nacional de Salud-Centro Nacional de Salud Pública (INS-CNSP), por darme la oportunidad de realizar la tesis en uno de sus prestigiosos laboratorios.

A la bióloga Mg. Elizabeth Anaya Ramírez, por la confianza depositada en mi persona para la ejecución del proyecto de investigación, por su asesoramiento y apoyo invaluable en el desarrollo de la parte experimental.

Al Biólogo Mg. Jorge León Quispe, por su valiosa asesoría. Infinitas gracias por todo el apoyo brindado; porque fue guía durante la redacción y revisión de la tesis, y tuvo palabras de aliento y motivación para continuar hasta culminar la redacción.

A todos los integrantes del laboratorio Metaxénicas Bacterianas, quienes tuvieron una actitud de apoyo y solidaridad en todo momento durante la ejecución de la tesis, especialmente a la bióloga Mg. Giovanna Mendoza Mujica, por su aporte valioso en la reactivación de la cepa.

A la bióloga Mg. Rosa Palacios Salvatierra, por su contribución en el soporte teórico y apoyo incondicional.

A mis profesores de la UNMSM, profesionales competentes que contribuyeron en mi formación académica y un especial agradecimiento al jurado revisor de la tesis.

ABREVIATURAS

EAG	Enfermedad del arañazo del gato
AB	Angiomatosis bacilar
PB	Peliosis bacilar
FOD	Fiebre de origen desconocido
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacil-(1)] etanosulfónico
EMEM	Medio Mínimo Esencial de Eagle con sales de Earles
SFB	Suero fetal bovino
PBS	Buffer Fosfato Salino
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
INS	Instituto Nacional de Salud
CNSP	Centro Nacional de Salud Pública
CNPB	Centro Nacional de productos Biológicos
ROM	Recepción y obtención de muestra
Vero	Células epiteliales de riñón de mono verde Africano.
Hep-2	Epidermoid carcinoma of larynx / human larynx carcinoma
ATCC	American Type Culture Collection
MC	Medio de crecimiento
MM	Medio de mantenimiento
HUVEC	Célula primaria endotelial de vena umbilical humana
TAAAs	Adhesinas Triméricas Autotransportadoras
HIF-1	Factor inductor de hipoxia
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
T4SS	Sistemas de secreción del tipo 4
Bad A	<i>Bartonella</i> adhesin A (Adhesina A de <i>Bartonella</i>)

TAA	Trimeric autotransporter adhesin (Adhesina trimérica autotransportadora)
FHA	Filamentous hemagglutinin A (Hemagglutinina A filamentosa)
UFC	Unidad formadora de colonias

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Género <i>Bartonella</i> y Bartonelosis.....	7
2.2. <i>Bartonella henselae</i>	12
2.2.1. Cultivo, morfología y comportamiento cultural.....	16
2.2.2. Bioquímica.....	18
2.2.3. Factores de virulencia.....	18
2.2.4. Mecanismos de patogenicidad.....	26
2.2.5. Patogenicidad y epidemiología.....	34
2.3. Métodos de estudio.....	37
2.3.1. Cultivos celulares en líneas continuas.....	37
2.3.2. Inmunofluorescencia Indirecta.....	39
2.3.3. Coloración Giménez.....	40
2.3.4. Método <i>Shell Vial</i>	41
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	42
3.1. Hipótesis.....	42
3.2. Objetivo General.....	42
3.3. Objetivos específicos.....	42

4. MATERIAL Y MÉTODOS	43
4.1. Material biológico	43
4.2. Metodología	43
4.2.1. Actividades de la etapa I	45
4.2.2. Actividades de la etapa II	56
5. RESULTADOS	59
5.1. Resultados etapa I	59
5.2. Resultados etapa II	70
6. DISCUSIÓN	74
7. CONCLUSIONES	77
8. RECOMENDACIONES	78
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
10. ANEXOS	92

ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

1. Especies del género <i>Bartonella</i> , vectores, reservorios, patologías.....	9
2. Manifestaciones clínicas por infección con <i>B. henselae</i>	14
3. Registro de la confluencia en monocapa de Células Vero en <i>Shell Vial</i>	60
4. Registro de la confluencia en monocapa de Células Hep-2 en <i>Shell Vial</i>	61
5. Número de días necesarios para mayor infección.....	63
6. IFI Porcentaje de infección en células Vero y Hep-2.....	69
7. IFI-Resumen global de pocillos evaluados para células vero	69
8. IFI-Resumen global de pocillos evaluados para células hep-2.....	69
9. Porcentaje de aislamientos primarios.....	71
10. Total de aislamientos primarios.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1. Distribución de T4SSs y flagelos en el género <i>Bartonella</i>	11
2. <i>B. henselae</i> , causante de bacteriemia intraeritrocítica.....	13
3. Electromicrografía y colonias características de <i>B. henselae</i>	16
4. Frascos y viales para cultivos celulares.....	17
5. Posibles interacciones.....	20
6. Expresión superficial de TAAs.....	21
7. Gráfico esquemático de las TAAs.....	22
8. Organización genética.....	24
9. Expresión de BadA.....	27
10. Composición de dominios de BadA.....	28
11. Diagrama esquemático BadA.....	29
12. Expresión superficial de BadA.....	30
13. Organización del dominio de homólogos BadA.....	31
14. <i>B. henselae</i> piliado.....	31
15. Formación de invasoma.....	32
16. <i>B. henselae</i> piliado.....	33
17. Invasoma HUVECS.....	33
18. Resumen de las actividades etapa I.....	45
19. Cultivos celulares.....	46
20. Cámara Neubauer.....	47
21. Colonias características.....	50
22. Cultivo células Vero y Hep-2.....	52
23. Materiales IFI.....	55
24. Resumen de actividades etapa II.....	56
25. <i>Shell Vials</i> inoculados.....	58

26.	Confluencia celular.....	59
27.	<i>B. henselae</i> en Agar Columbia.....	62
28.	IFI-Células Vero, Hep-2.....	64
29.	IFI Células Hep-2.....	65
30.	Células con ECP.....	66
31.	Células sin ECP.....	65
32.	Coloración Giménez.....	67
33.	Lámina IFI.....	68
34.	IFI-Aislamiento primario.....	70
35.	ECP en células Hep-2.....	71
36.	Resumen gráfico de los aislamientos primarios.....	72

RESUMEN

Bartonella henselae es un microorganismo Gram negativo, zoonótico, oportunista y cosmopolita, causante de diversas patologías humanas emergentes y reemergentes, que varían desde infecciones autolimitantes hasta fallas multiorgánicas y muerte dependiendo del estado inmunitario del afectado.

El presente estudio analítico-descriptivo fue desarrollado en dos etapas; en la primera, se estandarizó la prueba de aislamiento de *Bartonella henselae* cepa ATCC 49882 por el método de *Shell Vial* en líneas celulares continuas Vero y Hep-2, determinándose la línea celular más susceptible a la infección en un tiempo determinado de incubación. En la segunda etapa, se realizó el aislamiento primario empleando la técnica estandarizada, evaluándose 60 muestras de sangre total de pacientes procedentes del sistema de vigilancia de enfermedades febriles metaxénicas a nivel nacional (INS-CNSP) asociadas a factores epidemiológicos favorables a la infección por *Bartonella henselae*. Las muestras seleccionadas fueron reportadas como negativas a rickettsiosis y Enfermedad de Carrión. En ambas etapas, se determinó la presencia o ausencia del microorganismo de interés mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI-Bartonelosis), coloración Giménez y la valoración cualitativa del efecto citopático. Los resultados obtenidos aplicando la técnica estandarizada fueron, 5 aislamientos primarios a partir de 60 muestras de sangre total (3 en células Vero y 5 en células Hep-2) en un periodo de incubación de 12 días a 37°C. De los resultados obtenidos en el desarrollo de la primera y segunda etapa se concluyó que Hep-2 es la línea celular más susceptible a la infección por *Bartonella henselae*.

Palabras claves: *Bartonella henselae*, *Ctenocephalides felis*, cultivo celular, *Shell Vial*, efecto citopático.

ABSTRACT

Bartonella henselae is a Gram-negative, zoonotic, opportunist and cosmopolitan microorganism, responsible of diverse emergent and reemergents human pathologies that vary from autolimitant infeccions to multiorganic failures and death, depending of the inmunitarian status of the affected individual.

The present study descriptive-analytic was developed in two stages. In the first, the isolation test of *Bartonella henselae* strain ATCC 49882 was standardized with the *Shell Vial* method in continuous cell strains, Vero y Hep-2, determining the most susceptible cell line in an established incubation period. In the second stage, the primary isolation was realized applying the standardized technique, with 60 total blood samples evaluated from patients belonging to the surveillance system of metaxenic febrile diseases nationwide (INS-CNSP) associated to favourable epidemiological factors to infections with *Bartonella henselae*. The selected samples were reported as negative to rickettsiosis and *Carrion disease*. In both stages, the presence or absence of the analyzed microorganism was determined through the indirect immunofluorescence technique (IFI-Bartonellosis), Giménez coloration and the qualitative assessment of the cytopathic effect.

The results obtained applying the standardized technique came, 5 primary isolations from 60 samples of total blood (3 in Vero cells and 5 in Hep-2 cells) during a period of incubation of 12 days at 37 °C. From the results obtained in the development of the first and second stage, it was concluded that Hep-2 is the most susceptible cell line to the infection by *Bartonella henselae*.

Key words: *Bartonella henselae*, *Ctenocephalides felis*, cell culture, *Shell Vial*, cytophatic effect

1. INTRODUCCIÓN

El género *Bartonella* comprende especies causantes de enfermedades emergentes y reemergentes, humanas y veterinarias de gran importancia en salud pública. Algunas especies infectan solo al hombre, otras causan zoonosis y otras causan enfermedades solo en animales (Higgins, 2004; Blanco & Raoult, 2005; O'Rourke *et al.*, 2011). Después de más de dos décadas de estudio, el conocimiento sobre los mecanismos de infección y transmisión es aun limitado; siendo *Bartonella henselae* una de las especies zoonóticas más importantes (Kaiser *et al.*, 2011).

Los microorganismos del género tienen una amplia distribución a nivel mundial, con excepción de *Bartonella bacilliformis*, circunscrita geográficamente a América del sur en los países de Perú, Ecuador y Colombia (Maguiña, 2001; Koneman & Allen, 2008). La distribución geográfica de las diferentes especies, está determinada por el tipo de vector que precisan para la transmisión; así *B. bacilliformis* se encuentra limitada a regiones cercanas a la cordillera de los andes, hábitat del vector *Lutzomyia* spp. (Villaseca, *et al.*, 1999; Maguiña, 2001; Koneman & Allen, 2008), mientras que los vectores y reservorios para la transmisión de las demás especies del género son diversos y totalmente cosmopolitas (Zaror *et al.*, 2002; Anda *et al.*, 2007).

Las infecciones por *Bartonella* spp. son causantes de enfermedades con diversas manifestaciones clínicas; entre ellos, “la fiebre de las trincheras”, angiomatosis bacilar (AB), peliosis hepática y de bazo, endocarditis, enfermedad del arañazo del gato (EAG), bacteriemia intraeritrocítica de larga duración, neuritis óptica, meningitis aséptica, granuloma pulmonar y hepático, parálisis facial, paroniquia, osteomielitis, probables desórdenes neurológicos y la enfermedad de Carrión entre los más importantes (Koneman & Allen, 2008).

La EAG, es principalmente de naturaleza autolimitante y los pacientes usualmente no requieren tratamiento antibiótico, pero su administración acelera la remisión de la enfermedad. Sin embargo, el curso clínico de una infección por *Bartonella henselae* puede variar desde infecciones asintomáticas hasta infecciones severas y crónicas que puede provocar dificultades en el diagnóstico (Florín *et al.*, 2008; Franz & Kempf, 2011; O'Rourke, 2011). Por el contrario, en pacientes inmunodeprimidos (SIDA, cáncer, etc.), la infección puede dar lugar a la proliferación de vasos capilares principalmente en la piel dando lugar al desarrollo de la AB, o la peliosis hepática. El patógeno es detectable a partir de estas lesiones y el resultado del tratamiento con fármacos, es la regresión de los tumores angiomatosos (Franz & Kempf, 2011). El incremento en la población de infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana, amplía el riesgo de infección desde inmunocomprometidos hasta inmunocompetentes (Cornejo & Vizcarra, 1999).

El aislamiento de *Bartonella* spp. en cultivos convencionales es de crecimiento lento, en algunos casos llegan a durar hasta 45 días (Maurin *et al.*, 1994) lo que puede provocar un subregistro de diagnóstico de bartonelosis en aquellas regiones donde realmente existe la enfermedad y a la vez ocurren otras enfermedades metaxénicas con manifestaciones de síndrome febril. El cultivo para el aislamiento a partir de muestras sanguíneas infectadas por métodos convencionales, es reportado en diversas literaturas; sin embargo, estos deben ser incubados entre 27°C y 37°C por tiempos prolongados (al menos 3 semanas) bajo una atmósfera de CO₂ al 5% y una elevada humedad resultando el tiempo de incubación un problema para aislar e identificar al microorganismo (Cornejo & Vizcarra, 1999); en cambio, el cultivo celular ha probado ser de mayor sensibilidad y de crecimiento más rápido que otros cultivos (Drancourt *et al.*, 1995; Koehler *et al.*, 1997; Raoult *et al.*, 1999).

En Perú, la especie más estudiada es *B. bacilliformis*, causante de la enfermedad de Carrión, pero existen evidencias clínicas acerca de la existencia de otras especies del género causantes de otras patologías (Huarcaya *et al.*, 2001), cuyo impacto en salud pública aún no se ha podido determinar ya que no existen suficientes estudios de casos que demuestren la carga real en el país, siendo importante identificar los grupos humanos en riesgo de contraer infección por éstos microorganismos, desarrollando estrategias apropiadas de estudios de seroprevalencia a nivel nacional, para canalizar el diagnóstico y tratamiento oportuno de estas patologías (Huarcaya *et al.*, 2001).

De las patologías causadas por *B. henselae*, la EAG, es una de las más importantes y frecuentes en la población infantil básicamente. El diagnóstico clínico se basa en la detección de signos y síntomas característicos, además de los antecedentes epidemiológicos y factores de riesgo (exposición al vector-reservorio). Dependiendo del estado inmunitario de los afectados o probablemente de cepas bacterianas más o menos virulentas, la infección por *B. henselae* puede manifestarse clínicamente desde solo una linfadenopatía unilateral hasta desarrollar patologías con compromiso sistémico (Cornejo & Vizcarra, 1999).

En Perú, si bien en número limitado, hay reportes de casos clínicos de infección por *B. henselae* en diferentes centros de salud desde el año 1996; así mismo, existen estudios descriptivos transversales que confirman la ocurrencia de casos de infección por dicho microorganismo (Arias-Stella, *et al.*, 1996; Huarcaya *et al.*, 2001; Polanco *et al.*, 2008).

La dificultad principal para el diagnóstico apropiado y oportuno de infección por *B. henselae*, es el aislamiento primario en cultivos convencionales, constituyendo las pruebas serológicas las formas más frecuentes de diagnóstico; sin embargo, algunos pacientes nunca desarrollan anticuerpos a niveles en que la inmunofluorescencia

indirecta pueda detectarlos (Bergmans *et al.*, 1997; La Scola & Raoult, 1999; Schaller *et al.*, 2007).

La conducta humana determina la presencia de potenciales reservorios (mascotas) en los núcleos familiares, los que a su vez son factores epidemiológicos favorables a la emergencia y reemergencia de enfermedades causadas por *Bartonella* spp. Sumado a la carencia de programas de control sanitario de la población animal, son una realidad con implicancias en el desarrollo de enfermedades zoonóticas. Gran parte de nuestra población urbano-marginal vive en condiciones de hacinamiento e insalubridad haciendo favorable la propagación de diversas enfermedades.

La estandarización del método de aislamiento de *B. henselae* en líneas celulares por el método de *Shell vial*, será un aporte valioso como herramienta diagnóstica en clínica e investigación, lo que permitirá dilucidar cuál es la realidad de estas patologías en nuestro país, evitando así el subregistro de diagnóstico en aquellas regiones del Perú donde realmente existe la enfermedad y a la vez ocurren otras enfermedades metaxénicas con manifestaciones de síndrome febril, favoreciendo el entendimiento epidemiológico de las infecciones por dicho microorganismo.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Género *Bartonella* y *Bartonellosis*

Con anterioridad, *Bartonella henselae* se incluía en el orden de los *Rickettsiales*; posteriores análisis genéticos mediante técnicas de secuenciación de ARN ribosomal 16S e hibridación de DNA confirmaron que *Bartonella* es el único género en la familia *Bartonellaceae*. Esta familia reside en el orden propuesto “Rhizobiales” que está en el subgrupo α_2 de la clase Proteobacteria.

DOMINIO: Bacteria

PHYLUM BXII: Proteobacteria

CLASE I: Alphaproteobacteria

ORDEN VI: Rhizobiales

FAMILIA II: *Bartonellaceae*.

GÉNERO I: *Bartonella*

(Brenner *et al.*, 1993; Garrity *et al.*, 2001; Blanco & Raoult, 2005; Koneman & Allen, 2008).

Desde el descubrimiento de *B. bacilliformis* en 1905 por el científico peruano Alberto Barton, a la actualidad el género comprende 26 entre especies y subespecies, de los cuales, 13 son especies patógenas zoonóticas para el hombre (**Tabla 1**).

Estudios recientes señalan que las especies *Bartonella* infectan una gran cantidad de animales domésticos y silvestres, los que a su vez pueden sufrir la enfermedad o desarrollar una bacteriemia crónica asintomática, convirtiéndose en reservorios y fuentes potenciales de otras infecciones animales y humanas (Koneman & Allen, 2008). La transmisión ocurre principalmente a través de vectores artrópodos hematófagos o por contacto directo (Chomel, 2006).

El género *Bartonella* comprende microorganismos patógenos oportunistas tanto de humanos como de animales, con comportamiento intracelular facultativo, de difícil aislamiento y cultivo (La Scola & Raoult, 1999). Colonizan y parasitan eritrocitos y células del endotelio vascular y posiblemente también células del sistema retículo endotelial en el hospedero, provocando como característica principal una infección intraeritrocitaria de larga duración. Las células endoteliales parecen representar un importante tipo de células diana (nicho primario) para la colonización bacteriana en el reservorio y, probablemente, también en el hospedero infectado (Blanco & Raoult, 2005; Dehio, 2008 Franz & Kempf, 2011).

De las 13 especies patógenas para el hombre descritas hasta la actualidad, 6 han sido aisladas de animales domésticos como perros y gatos (Chomel 2006; Anda *et al.*, 2007). Entre las especies aisladas en gatos asintomáticos se encuentran *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. koehlerae* y *B. weissii*. También se han identificado especies de *Bartonella* en otros hospederos que cursan la infección de forma asintomática, como perros domésticos, coyotes, zorros, roedores, topes, corsas, wapitíes, ciervos, borregos muflones y ganado bovino doméstico (CFSPH, 2005). Las especies del género *Bartonella*, presentan grandes similitudes (con excepción de *B. bacilliformis* y *B. quintana* que tienen al hombre como único reservorio), ellas usan diversas especies de mamíferos como reservorio e infectan a los mismos tipos de células generando cambios vasculoproliferativos. **Tabla 1** (Blanco & Raoult, 2005; MINSA-INS, 2006).

La Enfermedad de Carrión, causada por *B. bacilliformis*, es conocida desde la antigüedad en los pueblos aborígenes andinos (Maguiña, 2001), el desarrollo de la enfermedad, es caracterizada por dos fases, una primaria hemática anemisante (aguda o bacteriémica) conocida como “fiebre de la Oroya” y una fase crónica vasculoproliferativa conocida como “verruga peruana”.

Tabla 1. Especies del género *Bartonella*, vectores, reservorio y patologías

	<i>Bartonella spp.</i>	Vector	Reservorio	Enfermedad en humanos
1	<i>B. alsatica</i>		Conejo	
2	<i>B. bacilliformis</i>	<i>Lutzomyia verrucarum</i> <i>Lutzomyia peruensis</i>	Hombre	Enfermedad de Carrión: anémica y eruptiva.
3	<i>B. birtlessi</i>		Ratas	
4	<i>B. bovis</i> ("B. weissii")		G. vacuno	
5	<i>B. capreoli</i>		Renos	
6	<i>B. clarridgeiae</i>	<i>Ctenocephalides felis</i>	Gato, coyote	EAG
7	<i>B. chomelii</i>		Vaca	
8	<i>B. doshiae</i>		Roedores	
9	<i>B. elizabethae</i>		<i>Rattus sp.</i>	Endocarditis, neurorretinitis
10	<i>B. grahamii</i>	<i>Ctenophthalmus novilis</i>	Roedores	Retinitis
11	<i>B. henselae</i>	<i>Ctenocephalides felis</i>	Gato	EAG, AB, PB hepático, bacteriemia, endocarditis, neuritis óptica, encefalopatía, granuloma pulmonar, parálisis facial, paroniquia, osteomielitis.
12	<i>B. koehlerae</i>	<i>Ctenocephalides felis</i>	Gato	Endocarditis
13	<i>B. quintana</i>	<i>Pediculus humanus corporis</i> <i>Ctenocephalides felis</i>	Hombre	Fiebre de las trincheras, linfadenopatía crónica, PB hepático, AB, bacteriemia, endocarditis, pericarditis, bacteriemia, hemorragia gastrointestinal, alteraciones neurológicas.
14	<i>B. peromysci</i>		Ratón	
15	<i>B. phoceensis</i>		Ratas	
16	<i>B. rattimassiliensis</i>		Ratas	
17	<i>B. rochalimae</i>	<i>Ctenocephalides sp.</i>	Zorros, coyotes, mapaches	Bacteriemia, fiebre,
18	<i>B. schoenbuchensis</i>		Corzas	
19	<i>B. talpae</i>		Topo	
20	<i>B. tamiae</i>	Ácaros (?)	Ratas (?)	Bacteriemia, fiebre.
21	<i>B. taylorii</i>	<i>Ctenophthalmus novilis</i>	Roedores	
22	<i>B. tribocorum</i>		<i>Rattus</i>	
23	<i>B. vinsonii subsp. vinsonii</i>		Roedores	Endocarditis
23	<i>B. vinsonii subsp. verkhoffii</i>		<i>Cannis sp. (coyotes)</i>	Endocarditis, arritmia cardíaca.
23	<i>B. vinsonii subsp. arupensis</i>		Roedores, perros	Bacteriemia, endocarditis, compromiso neurológico.
24	<i>B. washoensis</i>		Roedores	Miocarditis
	<i>Bartonella sp</i>	<i>Ixodes, Dermacentor</i>	Corzas	

(Adaptado de Gerrikagoitia, 2010; O'Rourke *et al.*, 2011; MINSA-INS, 2006)

La infección primaria es clínicamente caracterizada por una bacteriemia intraeritrocitaria precedida de una anemia hemolítica fatal causada por la invasión y destrucción masiva de los eritrocitos (mortalidad del 90% sin tratamiento antibiótico y del 8.8 % con tratamiento); esta fase inicia después de 3 semanas o tres meses después de la picadura del vector hembra infectado (*Lutzomyia* spp.) y el estadio dura de 2 a 4 semanas. La segunda fase de la infección crónica conduce a la formación de lesiones nodulares sobre las partes expuestas del cuerpo, sobre las mucosas o en los órganos internos. Estos nódulos se desarrollan en un periodo de 1 a 2 meses y pueden persistir durante meses o años (Koneman & Allen, 2008). Estos tumores surgen a consecuencia de una colonización vascular de las células endoteliales por *B. bacilliformis* causando tumoraciones verrucosas por proliferación del endotelio vascular. Estas verrugas pueden ser según el tamaño miliares (pequeñas), mulares (grandes) y nodulares (subdérmicas) (O'Rourke *et al.*, 2011).

La “fiebre de las trincheras” o “la enfermedad de las trincheras”, causada por *B. quintana*, es caracterizada por la aparición súbita de fiebre, seguida por periodos recurrentes de 5 días, en forma paralela a una bacteriemia intraeritrocitaria. Este microorganismo se encuentra en eritroblastos que residen en la médula ósea; dichas células sirven como nicho para una infección persistente desde donde el patógeno puede volver al torrente sanguíneo (O'Rourke *et al.*, 2011). Raoult *et al.*, (1999) reportaron su presencia en piojos humanos corporales *Pediculus humanus corporis*, en nuestro país.

Drancourt *et al.*, (1995), dividieron a *B. henselae* en dos genogrupos y serogrupos: *B. henselae* Houston, 16S tipo I (Houston I) y *B. henselae* Marsella, 16S tipo II (Koneman & Allen, 2008). El tipo I representa la mitad de todas las cepas en el este de EEUU. El tipo II es el serotipo predominante en Europa, y el tipo I predomina en Asia. Los estudios realizados a la fecha indican que las infecciones por uno u otro genogrupo de

B. henselae, no exhiben diferentes características epidemiológicas o clínicas (Zeaiter, 2002).

A diferencia de *B. bacilliformis* que posee una posición aislada en la filogenia *Bartonella* como un único representante de un linaje ancestral, las especies del género *Bartonella* evolucionaron de un linaje “moderno” separados por especiación radial y representan patógenos con alta adaptación al hospedero con virulencia de potencial limitado (Dehio, 2008). Así mismo, las especies del linaje moderno codifican al menos para uno de los sistemas de secreción del tipo 4 (T4SSs) (Dehio, 2008) (**Figura 1**).

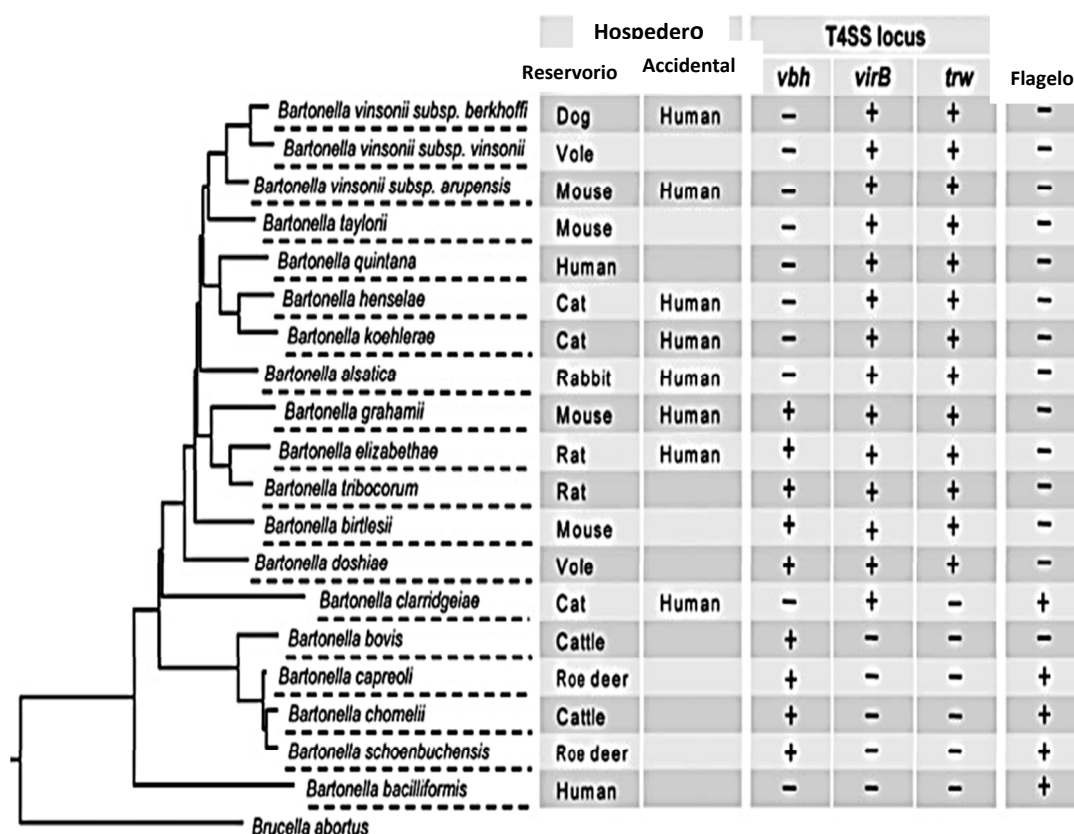


Figura 1. Distribución de T4SSs y flagelos en el género *Bartonella*. Izq: árbol filogenético del género *Bartonella*. Der: Tabla de resumen del hospedero específico y la presencia y ausencia del loci que codifica para T4SSs y flagelos en las diferentes especies de *Bartonella*. Tomado de Dehio, 2008.

2.2. *Bartonella henselae*

B. henselae es una α -proteobacteria, Gram-negativa, patógena, zoonótica, de distribución mundial, que presenta un fuerte tropismo por células endoteliales y eritrocitos como célula huésped, a las cuales es capaz de adherirse e invadir y sirve como un organismo modelo para la colonización vascular, es de difícil cultivo y nutricionalmente exigente. Hay estudios que sustentan el hecho de que este microorganismo facultativo intracelular, es capaz de ingresar en células humanas por fagocitosis pasiva convencional o activamente por un proceso patógeno-desencadenante conocido como internalización por invasomas, que implica la formación de un agregado bacteriano asociado a la superficie celular, que a continuación es envuelto por membranas de la célula hospedera resultando en su internalización completa. (Rhomberg, 2007). Es causante de una bacteriemia intraeritrocitaria de larga duración en su hospedero natural (reservorio) el gato, en forma asintomática (La Scola & Raoult, 1999; Chang *et al.*, 2002; Blanco & Raoult, 2005; Chomel, 2006).

B. henselae fue identificado por Wear y colaboradores en 1983, desde entonces ha sido aislada, caracterizada y reconocida como patógeno oportunista emergente que ha cobrado importancia como causa de morbilidad en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH); sin embargo, también puede hallarse angiomatosis bacilar y peliosis hepática bacilar en individuos inmunocompetentes (Tappero *et al.*, 1993b; CFSPH, 2005; Cotté *et al.*, 2008).

Es el agente etiológico de diversas patologías con distintas manifestaciones clínicas de variada intensidad relacionadas a la respuesta inmunitaria del afectado, desde manifestaciones clínicas autolimitantes, hasta el compromiso sistémico y muerte (Pachas, 2000; Ladrón de Guevara *et al.*, 2003). Entre los más importantes podemos mencionar la EAG en personas inmunocompetentes, relacionado directamente con la

edad y el estado nutricional; la AB, la PBH y de bazo (PBB) (**Figura 2**) (Dehio, 2005), bacteriemia, endocarditis, neumonía, síndrome óculoglandular de Parinaud, desprendimiento seroso de mácula, encefalopatía, neuroretinitis, fiebre de origen desconocido (FOD), osteomielitis (Clarridge, 1995; Cornejo & Vizcarra, 1999; Ladrón de Guevara, *et al.*, 2003; Blanco & Raoult, 2005) y probables desórdenes neurológicos, en inmunosuprimidos (Schaller *et al.*, 2007; Florin *et al.*, 2008; Lamas *et al.*, 2008; Laerte *et al.*, 2008), (**Tabla 2**).

A la fecha, aún queda por saber todos los mecanismos y formas de transmisión entre reservorios, hospederos y vectores, sin embargo, se sabe que la picadura de la pulga de gato (*Ctenocephalides felis*) infectado es el vector principal de transmisión de *B. henselae*, más aún, la enfermedad se transmite también por el arañazo, mordedura y/o lamida del felino (Álvarez *et al.*, 2003; Blanco & Raoult, 2005; IICAB, 2005; Asencio-Sanchez *et al.*, 2006). Sin embargo, hay reportes de casos de infección con *B. henselae* transmitido por *Dermacentor* spp. (Angelakis *et al.*, 2010) e *Ixodes ricinus* (Cotté *et al.*, 2008). La infección en gatos y perros es asintomática o con solo una fiebre ligera (Dehio, 2004; Dehio, 2008; Franz & Kempf, 2011).

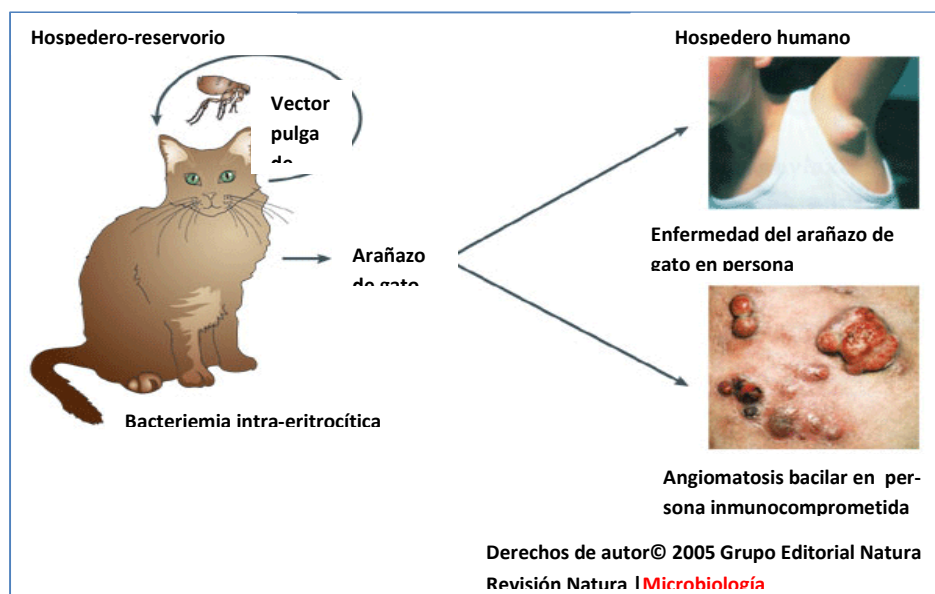


Figura 2. *B. henselae*, causante de bacteriemia intra-eritrocítica subclínica en su hospedero-reservorio felino y las manifestaciones clínicas en el humano. Tomado de Dehio, 2005.

La EAG se manifiesta después de 2 a 3 semanas de incubación y remite en 2 o 4 meses. La característica clínica más frecuente es la linfadenopatía regional crónica unilateral supurante (**Figura 2**), en cabeza, cuello o axila generalmente (región de drenaje linfático cercano al sitio de inoculación). Se observa una pápula o pústula primaria que persiste por 2 a 3 semanas más. Un tercio de estos pacientes puede presentar febrícula y un cuarto de ellos malestar general y fiebre. El 10% presenta cefaleas y mialgias asociadas a dolor de garganta. Los ganglios linfáticos afectados usualmente desarrollan granulomas, micro abscesos estelares e hiperplasia folicular (Koneman, 2008). El tratamiento antibiótico conduce a la regresión total de las lesiones angiomasas, indicando el papel activo de *B. henselae* como agente causal desencadenante de las proliferaciones vasculares del endotelio (Scheidegger, 2009).

Tabla 2. Manifestaciones clínicas por infección con *Bartonella henselae*

Más comunes
EAG típica (fiebre y linfadenopatía localizada solamente)
Fiebre prolongada
Enfermedad hepatoesplénica
Menos comunes
Síndrome oculoglandular de Parinaud
Neuroretinitis, enfermedad ocular del segmento posterior
Encefalopatía, estado epiléptico
Radiculopatía
Parálisis del nervio facial
Síndrome Guillain Barré
Arteritis cerebral
Mielitis transversa
Epilepsia parcial continua
Glomerulonefritis
Neumonía, efusión pleural
Púrpura trombocitopénica
Osteomielitis
Artritis/Artralgia
Endocarditis
Angiomatosis bacilar
Tomado de Florín, <i>et al.</i> , (2008).

Desde la primera descripción de la EAG gato por Debré y Mollaret como linforeticulosis inoculativa benigna en 1950 (Statsny *et al.*, 1996), se han realizado diversos estudios para encontrar al agente etiológico. En 1981 se detectaron bacilos en nódulos linfáticos provenientes de pacientes con EAG (Wear *et al.*, 1983). La acumulación de evidencias ha permitido precisar que el agente etiológico es *B. henselae* que inicialmente fue descrita como *Rochalima henselae* por Regnery (1992), aislada de un paciente con VIH. A este microorganismo se denominó como *B. henselae* en homenaje a Diane Hensel, microbióloga que trabajó en el aislamiento y la caracterización del microorganismo (Maguiña, 2001).

Se han realizado estudios de infección experimental de *B. henselae* de un gato a otro a través de pulgas infectadas (Chomel *et al.*, 1996); la transmisión entre felinos sucede principalmente por la pulga del gato, siendo el hombre un hospedero accidental (Dehio, 2005; Rhomberg, 2007) asociado al contacto de gato bacteriémico (Chomel *et al.*, 1996; Álvarez *et al.*, 2003; Lamas, 2010). En dichos experimentos, se infectaron a gatos sin patógenos específicos con pulgas de gatos bacteriémicos. También se demostró que gatos bacteriémicos sin pulgas, no infectaron a gatos sanos. Este microorganismo puede multiplicarse en la pulga y permanecer viable en las heces hasta por tres días (Koneman & Allen, 2008).

Los estudios de seroprevalencia veterinaria han documentado una tasa alta de infección por *B. henselae* entre los gatos en distintas partes del mundo pudiendo permanecer asintomáticos por largos periodos de tiempo. Las bacteriemias suelen ser recurrentes en los gatos infectados, dando lugar a microorganismos genéticamente distintos durante picos de bacteriemia recurrente, pudiendo contribuir al establecimiento de infecciones persistentes en estos animales (Koneman & Allen, 2008).

2.2.1. Cultivo, morfología y comportamiento cultural

B. henselae es una bacteria de forma bacilar, pleomórfica, aerobia y capnófila, Gram negativa, mide de 0.5-0.6 μm de ancho por 1-2.5 μm de largo (**Figura 3 A**), lenta y de difícil crecimiento (Dehio, 2004; Franz & Kempf, 2011). Puede ser aislada en medios convencionales apropiados como el agar Columbia enriquecido con sangre desfibrinada o mediante el cultivo celular (Regnery *et al.*, 1992; Koneman & Allen, 2008).

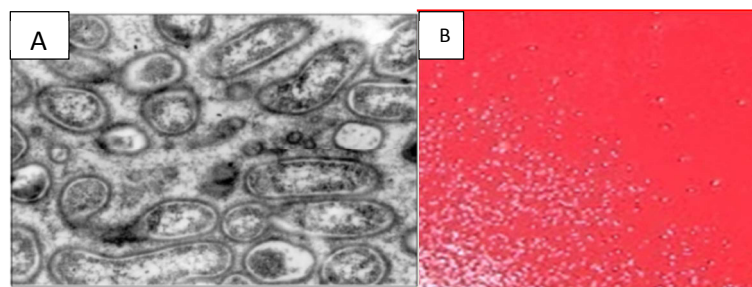


Figura 3. (A) Electromicrografía mostrando conglomerados de *Bartonella*, de pared trilaminar aglutinados por material denso, 60.000X. Tomado de Rodríguez, *et al.*, 2002. (B) Colonias características de *B. henselae* cepa ATCC 49882 con 5 días de crecimiento en Agar Columbia suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 10%.

El desarrollo en cultivos convencionales basados sobre agar como BHI, Columbia y Agar Chocolate enriquecido, pueden favorecer el crecimiento pero son lentos; en agar sangre, los primeros aislamientos se obtienen después de 12 a 20 días prolongándose en muchas ocasiones hasta 45 días (Maurin *et al.*, 1994). En el aislamiento primario, las colonias son características: se observan secas, adherentes, blancas, pequeñas y rugosas “similares a una coliflor”, haciéndose más lisas y menos adherentes después de varios pasajes como es el caso de subcultivos de cepas patrón (**Figura 3 B**). Algunas cepas de *B. henselae*, *B. elizabethae* y *B. quintana*, pueden deprimir la superficie del agar durante su crecimiento. (Maurin & Raoult, 1998; Koneman & Allen,

2008). Los subcultivos posteriores al aislamiento primario, muestran un crecimiento más rápido, entre 3-5 días (Blanco & Raoult, 2005; Koneman & Allen, 2008).

No existen medios selectivos y no deben emplearse medios que contengan antibióticos. El crecimiento óptimo es de 35-37°C, atmósfera húmeda (Cornejo & Vizcarra, 1999; Koneman & Allen, 2008), el medio de cultivo debe contener de 5-10% de sangre de conejo, oveja o caballo. La incubación se realiza preferentemente en presencia de 5% de CO₂. (Excepcionalmente dentro del género, *Bartonella bacilliformis* se desarrolla bien a temperaturas de 25-28 °C y no requiere suplemento de CO₂ ni hemina para su aislamiento) (Koneman & Allen, 2008).

Líneas celulares como Hela, Hep-2, Vero, células endoteliales humanas ECV 304, célula endotelial bovina, células L292, HUVECS, desarrollan bien en frascos de polipropileno permitiendo ensayar aislamientos de *B. henselae* (**Figura 4**).



Figura 4. Frascos y *Shell Viales* con cultivos celulares para el aislamiento de *B. henselae*.

Así también, la técnica de cultivos celulares permite realizar aislamientos a partir de biopsias de diversas lesiones como la angiomatosis bacilar, lesiones cutáneas, ganglios linfáticos, óseas y sangre de pacientes con la enfermedad del arañazo de gato (Blanco & Raoult, 2005; Koneman & Allen, 2008) en medios definidos que contengan medio líquido tipo cultivo tisular suplementado con hemina, piruvato y aminoácidos (Koneman & Allen, 2008; Scheidegger, 2009).

2.2.2. Bioquímica

Las especies del género *Bartonella*, son bioquímicamente inertes (excepto para las peptidasas) y no reactivas en pruebas de identificación de rutina como las pruebas de oxidasa, catalasa (excepto *B. bacilliformis*), indol, ureasa, descarboxilasa y nitrato reductasa (Brenner *et al.*, 1983; Birtles *et al.*, 1995; Koneman & Allen, 2008). No utiliza azúcares (fructosa, inositol, lactosa, maltosa, manitol, rafinosa, ni sucrosa) que se encuentran en la mayoría de las pruebas bioquímicas de identificación comercial (Anda *et al.*, 2007). Existen otros métodos presuntivos y definitivos para la identificación de especies de *Bartonella*, entre ellos, métodos fenotípicos, métodos quimiotaxonómicos que utilizan análisis de ácidos grasos y técnicas moleculares como PCR y secuenciamiento de ácidos nucleicos (Koneman & Allen, 2008).

La identificación presuntiva de *B. henselae* puede determinarse con sistemas de identificación que utilizan sustratos enzimáticos cromogénicos para detectar enzimas bacterianas preformadas. Los sustratos de las peptidasas que resultan degradadas por *B. henselae* son: leucilglicina, prolina, fenilalanina, arginina, serina, alanina, lisilalanina, arginilarginina, glicilarginina y glicina (Cornejo & Vizcarra, 1999).

2.2.3. Factores de virulencia

A la fecha, es poco el conocimiento que se tiene acerca de los factores de patogenicidad de *B. henselae*. Existen dificultades técnicas para la realización de estudios genéticos moleculares sobre este microorganismo, particularmente, por ser de crecimiento lento y tedioso, además de la falta de modelos animales adecuados para estudios *in vivo* de la patogenicidad; existen solamente en una extensión limitada para las enfermedades bacteriémicas y están completamente ausentes para los trastornos vasculoproliferativos (O'Rourke *et al.*, 2011).

A pesar de las dificultades mencionadas, dos factores esenciales determinantes de la patogenicidad de *B. henselae* se ha investigado e identificado en los últimos años: (i)

La adhesina A de *Bartonella* (BadA), perteneciente a la familia de adhesinas triméricas autotransportadoras (TAAs) que media la adhesión a la matriz extracelular de células hospederas de mamíferos y (ii) el sistema de secreción de tipo IV (T4SS) VirB/VirD4, que modula las funciones de la célula hospedera del mamífero mediante la inyección de proteínas efectoras *Bartonella* (Beps: A-G) (Franz & Kempf, 2011). Las funciones que desempeñan estas dos estructuras son cruciales para la infección; ambas pueden proporcionar elementos importantes en el proceso de múltiples pasos que conduce a la neoangiogénesis. Cabe la hipótesis de que BadA y el T4SS VirB/VirD4 pueden interactuar durante el proceso de infección que resulta en una relación sinérgica en la que BadA no sólo proporciona la adherencia inicial, sino también mantiene la distancia óptima entre la bacteria y el hospedero para la efectiva translocación de proteínas efectoras (O'Rourke *et al.*, 2011). Se sabe además, de la presencia de otro sistema de secreción de tipo IV: (iii) Trw, además de otras adhesinas y hemaglutininas filamentosas que podrían también contribuir a la patogenicidad de *Bartonella henselae*.

Se puede asumir que BadA y FHA actuarían como adhesinas específicas y/o inespecíficas asegurando un contacto estable con la superficie de la célula hospedera para la interacción posterior bacteria-célula hospedera por los sistemas de secreción VirB/VirD y Trw (Franz & Kempf, 2011).

A. Adhesina A de *Bartonella*

BadA, es una proteína no fimbrial, de membrana externa, miembro de la familia de las TAAs que representa un importante factor de virulencia. Tiene un peso molecular de 1000 kDa, con 3000 aminoácidos de residuo que resultan en un tamaño de ~328 kDa por monómero y una longitud extraordinariamente larga de aproximadamente 240 nm (Franz & Kempf, 2011; Kaiser *et al.*, 2012), (**Figura 5**); esta proteína media la adhesión bacteriana a las células endoteliales del hospedero reordenando la fibronectina y

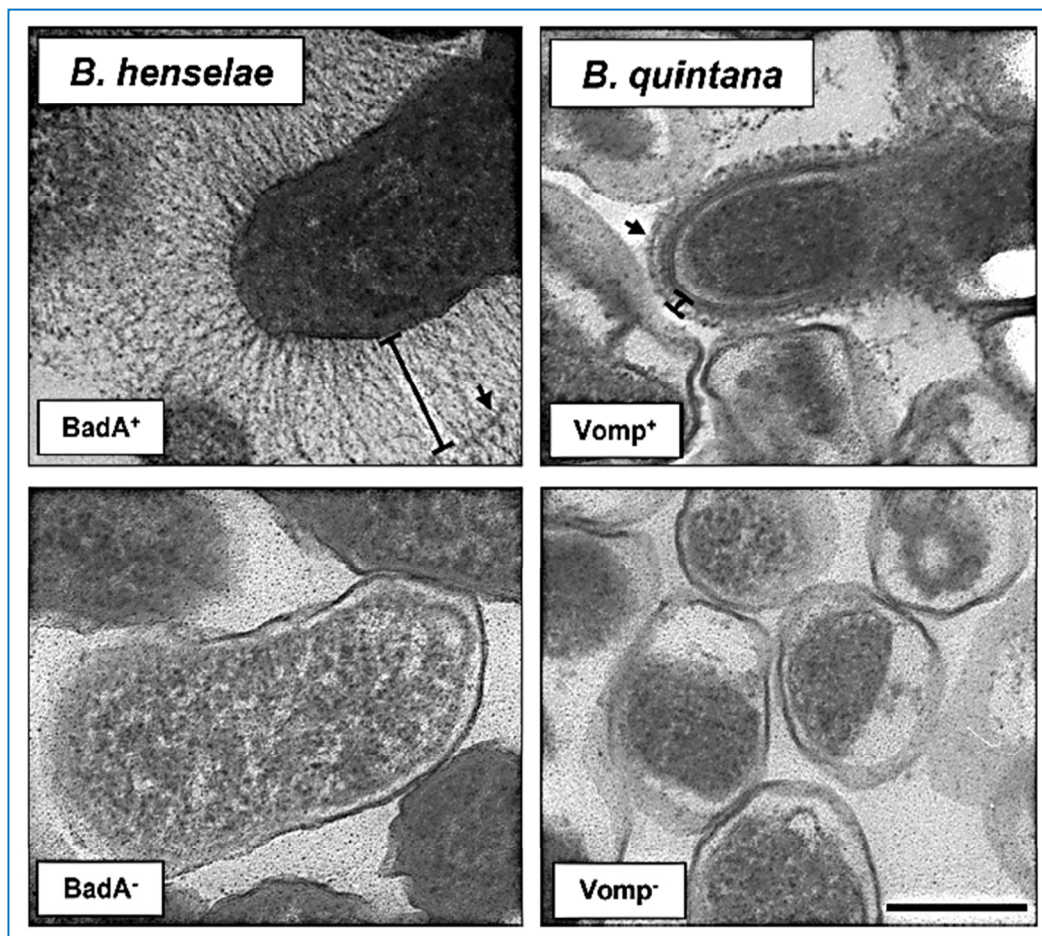


Figura 6. Expresión superficial de TAAs: BadA (*B. henselae*) y VompB (*B. quintana*) detectado por microscopía electrónica de transmisión. Nótese la expresión de BadA (log. ~ 250 nm) sobre la superficie de *B. henselae* tipo salvaje (ausente en *B. henselae* BadA⁻ cepa) y la de Vomps (long. ~ 40 nm) sobre la superficie de *B. quintana* JK31 (ausente en *B. quintana* 2D70). La densidad electrónica de la estructura globular sobre la superficie de las adhesinas BadA y Vomps, representando presuntamente al dominio de la cabeza (flechas). Tomado de Müller *et al.*, 2011.

Las TAAs del género *Bartonella* comparten algunas características notables que las diferencian de las de otras bacterias: a) ellas varían enormemente en longitud, b) con frecuencia, más de una variante o fragmento de gen *taa* está presente en su genoma y c) éstas, están altamente conservadas dentro del género (O'Rourke *et al.*, 2011), (Figura 13).

In vitro, se ha demostrado que los pasajes sucesivos de *B. henselae* generan la pérdida de la capacidad de expresión de BadA, (Batterman *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 2011), (**Figuras 6, 7 y 13**).

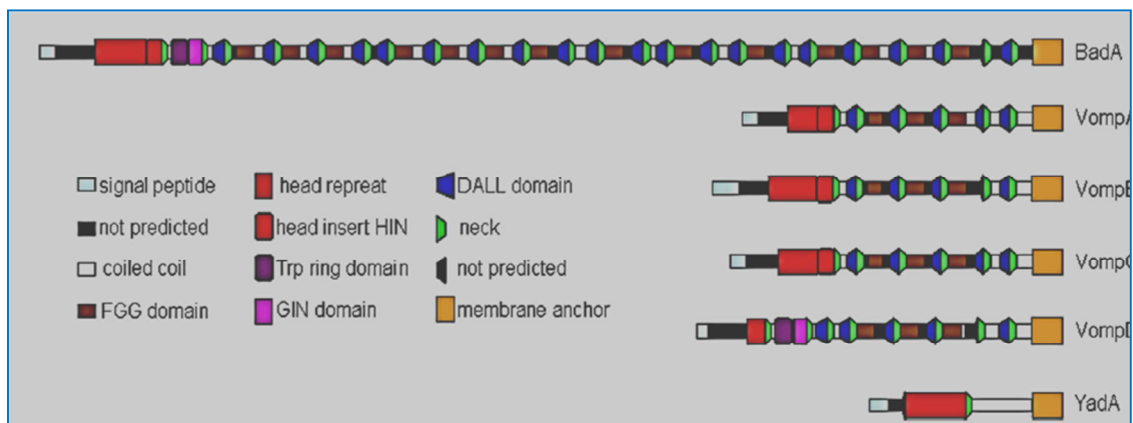


Figura 7. Gráfico esquemático de las TAA BadA de *B. henselae*, VompA a VompD de *B. quintana*, y YadA de *Y. enterocolitica*. Los dibujos están a escala (basada en la longitud de la secuencia) y muestra la diferencia de longitud en los extremos que también se puede ver en las micrografías electrónicas. (Adaptado de la referencia con permiso para la publicación). Tomado de Müller *et al.*, 2011.

B. Sistemas de secreción tipo IV (T4SS): VirB/VirD4

El sistema de secreción del tipo IV VirB/VirD4 T4SS, es un factor esencial de virulencia de *B. henselae* y son macromoléculas de al menos 10 componentes esenciales denominados VirB2-VirB11, además de un receptor de reconocimiento de sustrato asociado, conocido como la proteína de acoplamiento de la secreción de tipo IV, VirD4 (**Figura 8**), (Dehio, 2008).

VirB/VirD4 T4SS, es un conjunto de proteínas supramoleculares ensambladas, propio de bacterias gran negativas, que actúan como “inyectores moleculares” (Dehio, 2008; O’Rourke *et al.*, 2011), involucrados en los procesos de los mecanismos de secreción

que abarcan tanto la membrana interna y externa mediante canales de secreción, para la translocación de factores de virulencia como son las proteínas efectoras bacterianas (Beps) hacia células hospederas eucariotas o bacterianas y que además median la transferencia de DNA interbacterial (conjugación) por pilis o filamentos de superficies sobresalientes (Rhomborg, 2007; Dehio, 2008). El sistema VirB/VirD4 constituye un completo T4SS con la localización de ATPasas en la membrana interna para energizar los procesos de secreción, como para la construcción de canales de secreción a través de la membrana interna, el periplasma y la membrana externa (Dehio, 2008).

A la fecha, 7 proteínas efectoras *Bartonella* han sido identificadas (BepA-BepF). BepA tiene la función de inhibir la apoptosis de las células endoteliales y promover el crecimiento capilar. Además, BepG inhibe el crecimiento dependiente de BepA, por tanto, ambas proteínas pueden controlar la angiogénesis durante la infección por *B. henselae*. La acción combinada de BepC y BepF, pero también de la propia BepG, inducen la internalización por “invasoma”, por inhibición de la endocitosis bacteriana (Franz & Kempf, 2011).

Este sistema de secreción deriva evolutivamente de sistemas de conjugación involucradas en la transferencia horizontal de genes, usado por las bacterias para dos objetivos fundamentales relacionados con la patogénesis: el intercambio genético y la entrega de efectores moleculares en las células eucariotas blanco, y al mismo tiempo representan un problema de gran importancia en clínica y salud pública porque representan un mecanismo de transmisión de genes de virulencia y genes de resistencia a los antibióticos, además de alterar funciones celulares específicas para el establecimiento de la infección crónica. Es responsable de la inhibición de la apoptosis de la célula hospedera, la persistencia bacteriana en los eritrocitos, y la proliferación endotelial (Dehio, 2008; Franz & Kempf, 20011).

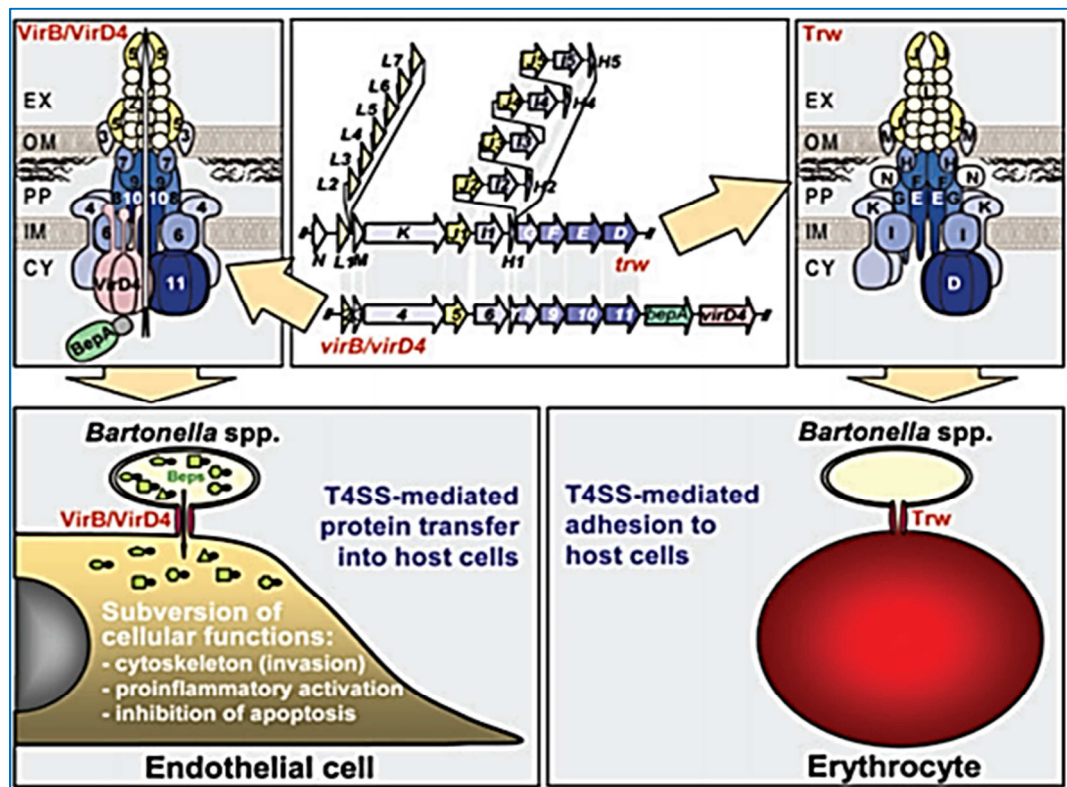


Figura 8. Organización genética y modelo de la arquitectura de VirB/VirD4 y Trw, y su rol en la infección de la célula hospedera. **Superior:** Organización genética del T4SS locus *virB/virD4* y *TRW* (centro) y el modelo hipotético de las arquitecturas de VirB/VirD4 (izquierda) y TRW (derecha). EX, matriz extracelular; OM, membrana externa; PP, periplasma; IM, membrana interna; CY, citoplasma; **Abajo:** Rol de estos T4SSs en la infección de la célula hospedera. El sistema VirB/VirD4 (izquierda) inyecta un cóctel de efectores Bep en las células endoteliales y, por tanto media la alteración de múltiples funciones en las células hospederas. El sistema Trw (derecha) que expresa variantes de los componentes del pilus, se considera que desempeñan un papel importante en la adhesión e invasión de los eritrocitos. Tomado de Dehio, 2008.

La principal función de VirB/VirD4 T4SS parece ser la modulación de la célula endotelial. Éste es responsable de (a) “la formación del invasoma” mediando el reordenamiento masivo de actina del citoesqueleto adyacente, dando lugar a la formación de agregados bacterianos en la superficie celular que subsecuentemente se internalizan en forma de una única estructura conocida como “invasoma”, formando posteriormente vacuolas de infección; (b) programación del gen pro-inflamatorio

[activación del factor nuclear (NF) kappa B-dependiente, secreción de interleucina-8, expresión de moléculas de adhesión intercelular ICAM-1 y E-selectina]; y (c) la inhibición de la muerte celular por apoptosis de las células endoteliales. Además, la VirB/VirD4 T4SS, al parecer, modula los efectos mitogénicos de *B. henselae* sobre las células endoteliales (Dehio, 2008; Rhomberg, 2007).

C. Sistema de secreción tipo IV (T4SS) Trw

Es otro sistema de conjugación esencial identificado recientemente; desempeña un papel importante en el proceso de infección ya que media la adherencia específica a los eritrocitos, mas no a las células endoteliales. Por tanto, es un importante factor de patogenicidad en la bacteriemia crónica en el hospedero primario (reservorio) interactuando con adhesinas durante el proceso de la infección (Franz & Kempf, 2011; O'Rourke *et al.*, 2011), (**Figura 8**). Los efectores translocados por Trw no son conocidos aun (**Figura 5**), pero producen múltiples variantes de subunidades de pilis implicados directamente en la invasión de los eritrocitos. De este modo, los T4SSs han adoptado diversas funciones durante la infección, destacando su versatilidad como factores de patogenicidad (Dehio, 2008; Franz & Kempf, 2011).

D. Hemaglutinina filamentosa

Las hemaglutininas filamentosas (FHA) representan adicionalmente, potenciales factores de patogenicidad que aún no han sido bien caracterizadas; sin embargo, se sabe que median la adherencia a la célula hospedera incrementando la patogenicidad.

En contraste con las TAAs, la presencia de la hemaglutininas filamentosas (FhaB) depende necesariamente de una segunda pareja de proteínas (FhaC/HecB). Después de la secreción Sec-dependiente de ambas proteínas al periplasma, FhaC/HecB, se forma una porina beta-barril transmembrana que permite a FhaB atravesar la

membrana externa y posteriormente en la superficie celular ser modificada y alcanzar la madurez final (Franz & Kempf, 2011).

Posiblemente, la adhesina BadA, más la FHA, realizan el cierre de contacto con la membrana hospedera y median la distancia para la translocación de las proteínas efectoras (Franz & Kempf, 2011), (**Figura 5 y 6**).

2.2.4. Mecanismos de Patogenicidad

La adherencia mediante adhesinas a la célula hospedera es la primera y más importante etapa en el proceso de la infección bacteriana y una de las características decisivas en la patogenicidad de *B. henselae*. Para asegurar una eficiente adhesión, la bacteria expresa proteínas complejas de superficie con la habilidad de unirse a componentes moleculares del hospedero (O'Rourke, 2011), (**Figura 9**). La TAA BadA, es la mejor estudiada y comprendida del género; ésta es imprescindible para la adhesión a la célula hospedera y a las proteínas de la matriz extracelular, particularmente a la fibronectina, laminina y colágenos (**Figura 16**). Además, la expresión de BadA está claramente vinculada a la capacidad de *B. henselae* de desencadenar una respuesta proangiogénica de la célula hospedera vía la activación del factor de transcripción HIF-1 y la secreción de citoquinas angiogénicas como el factor de crecimiento del endotelio vascular VEGF, interleucina-8, etc. (O'Rourke *et al.*, 2011). Durante el ensamblaje, las TAAs son secretadas en el periplasma a través de la vía secretora Sec; en la superficie bacteriana, estas se ensamblan en forma modular en estructuras triméricas características descritas como “lollipop-like” (chupetines), combinando cuatro elementos conservados (4 dominios) designados como “anclaje a la membrana”, “tallo”, “cuello” y “cabeza”.

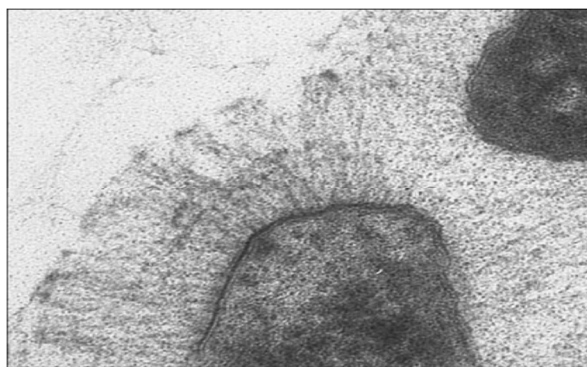


Figura 9. Expresión de BadA de *B. henselae*. Nótese la extraordinaria expresión de BadA formando una capa densa en la superficie bacteriana (longitud ~240 nm). Microscopía electrónica de transmisión por Heinz Schwarz. Tomado de O'Rourke *et al.*, 2011.

Las TAAAs son definidas por su C-terminal del dominio “anclaje a la membrana”, el cual es responsable de la actividad autotransportadora y es altamente homóloga en toda la familia TAA (**Figura 13**). Se sabe que los dominios “anclaje a la membrana” C-terminales, secretan en el periplasma. Luego, estos forman la porina trímero β -barril de 12 hebras en la membrana externa a través del cual los “efectores” son transportados hacia la célula infectante (O'Rourke *et al.*, 2011; Franz & Kempf, 2011).

La enorme longitud de BadA (~240 nm) está formado en un extremo por una “cabeza” y en el otro por un “anclaje de membrana”; al medio está formado por múltiples repeticiones de elementos de “cuello-tallo” en forma modular (22 repeticiones) en estructuras de doble enrollamiento (doble espiral). Esta repetición resulta en una larga y fibrosa estructura BadA de muchísimo mayor longitud que el prototipo YadA de *Yersinia enterocolitica* (~23nm), (**Figura 10**). El propósito y significancia de esta longitud no ha sido bien dilucidado, tal es así, que la organización del dominio de homólogos de BadA dentro del género *Bartonella* varía significativamente, (O'Rourke *et al.*, 2011; Kaiser *et al.*, 2012), (**Figura 13**).

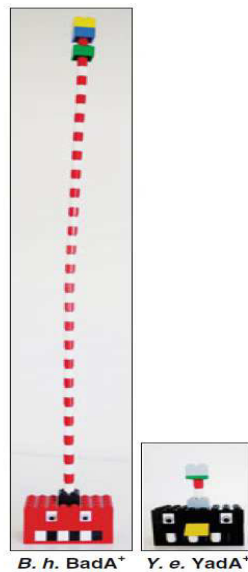


Figura 10. Composición de dominios de BadA (“concepto bloques-lego”): Modelo de organización modular de dominios de las TAA adhesina A de *Y. enterocolitica* (YadA) y adhesina A de *B. henselae* (BadA). Los “bloques” [“anclaje a la membrana” (YadA: gris, BadA: negro), repeticiones “cuello-tallo” (rojo-blanco) y el dominio “cabeza” (YadA: gris/verde, BadA: verde/rojo/azul/amarillo)] están presentes en todas las TAA. Tales “bloques” actúan como módulos que comparten funciones similares (por ejemplo, “anclaje de membrana”: el anclaje de la adhesina en la membrana externa; “cuello”(s): motivo de trimerización; “cabeza”: adhesión a la célula hospedera. ⁺ *B. h.*: *Bartonella henselae*, *Y. e.*: *Yersinia enterocolitica*. Tomado de O’Rourke *et al*, 2011.

Kaiser *et al.*, (2012), analizaron en detalle BadA mutantes por delección de la cabeza y de diferentes longitudes cuello-tallo del módulo cuello/tallo (de 1 a 4 repeticiones) para la inducción de secreción del factor de crecimiento del endotelio vascular (**Figuras 11 y 12**). Estas delecciones, fueron producidos y funcionalmente analizadas por su habilidad de unión a la fibronectina, al colágeno y a las células endoteliales. Mientras que una versión corta de BadA con cabeza y 1 repetición de cuello/tallo, demostró carecer exclusivamente de unión a la fibronectina, una Bad A mutante sin cabeza y versión corta, demostró ser deficiente para todas las funciones biológicas mencionadas. La expresión de una versión larga sin cabeza con 4 repeticiones de

cuello/tallo restauró la unión a la fibronectina, al colágeno y la adherencia a la célula hospedera con la inducción de secreción del factor de crecimiento vascular (VEGF). Los resultados obtenidos sugieren que el dominio cabeza es crucial para la adherencia a la célula hospedera (uniéndose a varias proteínas de la matriz extracelular), que el tallo de BadA es exclusivamente responsable de la unión a la fibronectina y que tanto cabeza y tallo de BadA median la adhesión al colágeno de células huésped y que además, inducen la secreción de VEGF indicando la superposición de funciones de cabeza y tallo de BadA.

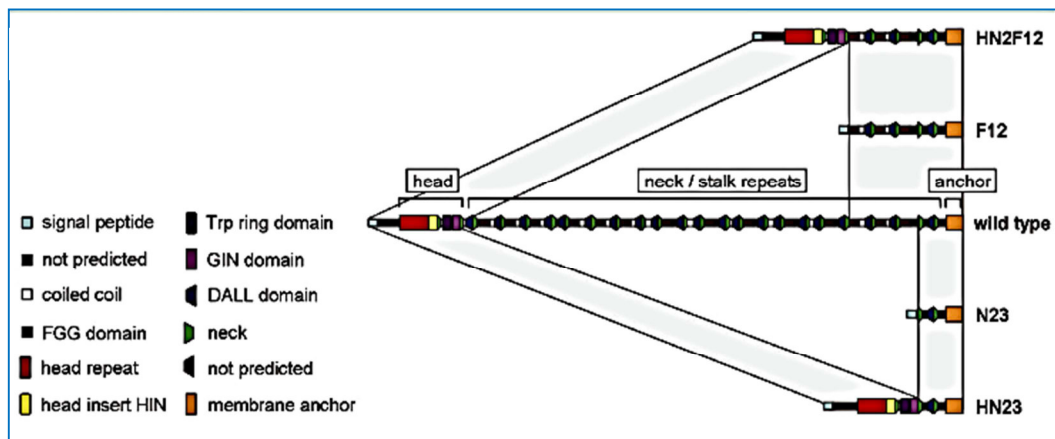


Figura 11. Diagrama esquemático y organización de dominios de BadA mutantes truncados en el tallo. BadA de *B. henselae* Marsella tipo silvestre se compone de izquierda a derecha, la cabeza, el tallo incluyendo las repeticiones cuello-tallo y el anclaje de la membrana. Tomado de Kaiser *et al.*, 2012.

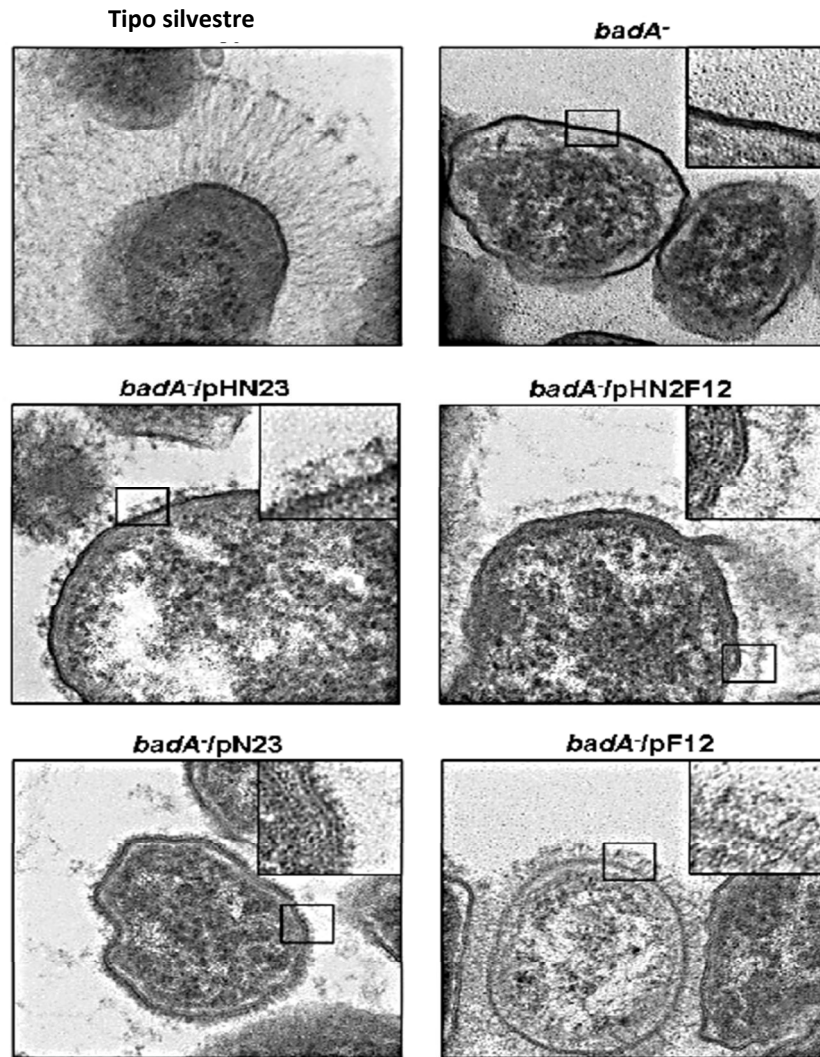


Figura 12. Expresión superficial de BadA tallos mutantes analizados por TEM. En *B. henselae* del tipo silvestre, la típica densidad sobre la superficie mostrando una capa “pelúcida” larga de BadA (~240 nm), es visible su ausencia en la superficie de *B. henselae* BadA⁻. La diferente longitud de las variantes BadA truncadas pudieron ser detectadas como capas densas de ~24 nm de longitud de BadA HN23 y de ~40 nm de longitud de BadA HN2F12 cada uno expresado en la superficie de *B. henselae*. Las estructuras densas en las puntas son las cabezas de las adhesinas. Tomado de Kaiser *et al.*, 2012.

Los análisis de PCR realizados a cepas de *Bartonella* revelaron variaciones en la longitud del tallo según la especie (O’Rourke *et al.*, 2011), (**Figura 13**). El gen BadA de *B. tribocorum* es la TAA más larga hasta ahora observado. En *B. bacilliformis*, 3 genes Brp fueron encontrados, ellos difieren en longitud y en la estructura del dominio cabeza; uno de ellos es muy similar en la estructura de la cabeza a la más corta TAA

BadA-like de *B. henselae*, mientras que los otros son más similares a Vomp A-C de *B. quintana*.

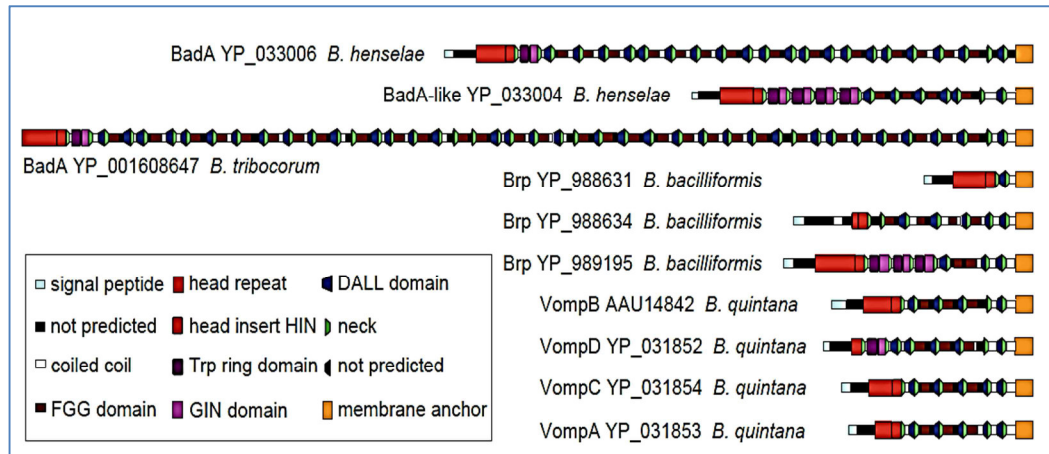


Figura 13. Organización del dominio de homólogos de BadA dentro del género *Bartonella*. En la figura, la anotación de BadA es de *B. henselae* Marsella, que alberga una copia intacta del gen BadA. Tomado de O'Rourke *et al.*, 2011.

In vitro, *B. henselae* exhibe un fenotipo más invasivo según tenga menor número de pasajes. Esta propiedad está asociada a la expresión de pilis del tipo IV que median la adherencia para la infección (Batterman *et al.*, 1995), (**Figura 14**).

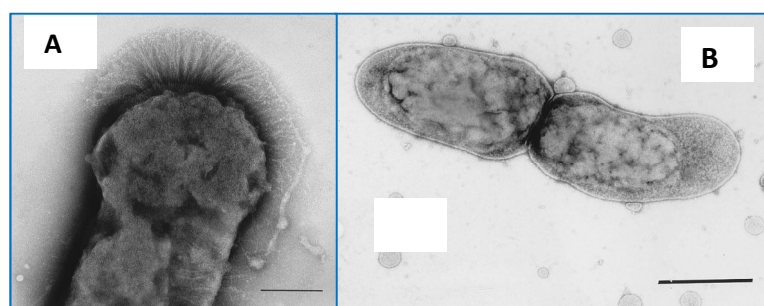


Figura 14. (A) *B. henselae* piliado (bajo número de pasaje) con tinción negativa con TEM. Bar 0.5µm. (B) *B. henselae* no piliado, demostrando la variación de fase en la expresión de pilis después de múltiples. Bar = 0.5 µm. Tomado de Batterman *et al.*, 1995).

Durante la infección, la internalización de *B. henselae* en células endoteliales (ECs) induce la reorganización de la membrana plasmática de la célula hospedera y el reordenamiento masivo de la F-actina del citoesqueleto subyacente, lo que resulta en la internalización de un solo bacilo y la posterior absorción de los agregados bacterianos, por una estructura invasiva única, denominado invasoma (Rhomberg, 2007). Esta última implica la formación de un agregado bacteriano asociado a la superficie celular, que a continuación es envuelto por las membranas de la célula huésped resultando en su internalización completa (**Figs. 15 y 16**).

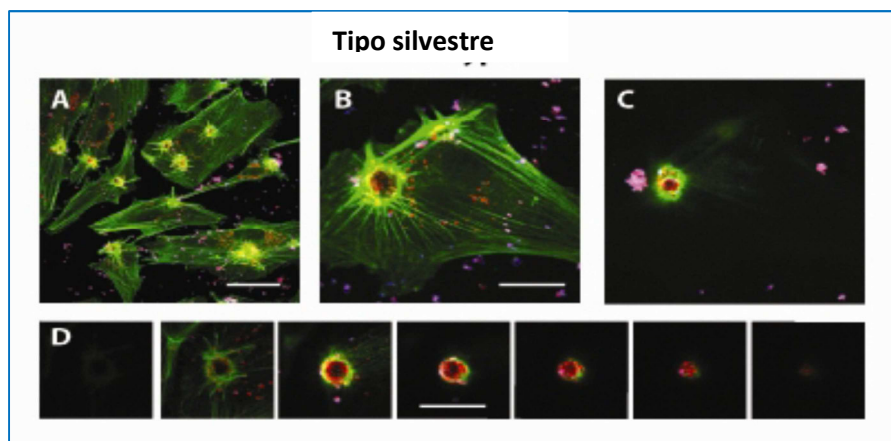


Figura 15. Formación de invasoma visto por microscopía confocal de barrido láser. Células endoteliales infectados con *B. henselae* de tipo silvestre durante 48 horas (MOI = 100). (A) Vista desde abajo, 40 aumentos, (B) vista desde abajo, ampliación 126x; (C) vista desde arriba, ampliación 126x; (D) secciones transversales seriadas de abajo hacia arriba. Escala (20µm). Tomado de Rhomberg, 2007.

En células endoteliales primarias de vena umbilical humanas (HUVECs), típicamente, un invasoma comprende una parte basal de anillo de fibras retorcidas de tensión de F-actina anclados por placas de adhesión focal, es decir, el agregado bacteriano reside sobre esta estructura internalizada por protrusiones de membrana y es sostenida por F-actina cortical y fosfotirosinas (Rhomberg, 2007).

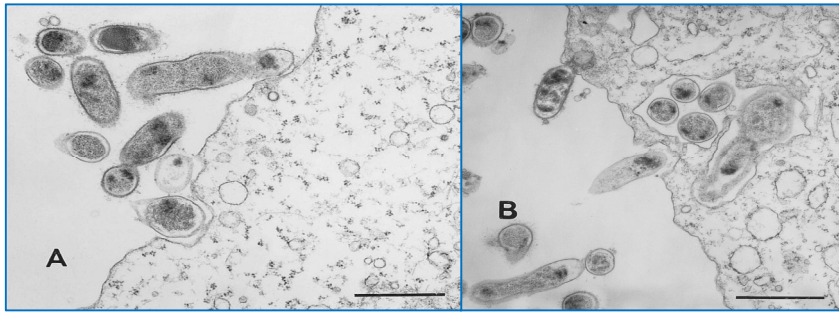


Figura 16. *B. henselae* piliado de pocos pasajes después de 2 h de asociación con células Hep-2. (A) Grupo de bacterias sobre la superficie de la célula con evidencia de eventos de ingreso temprano. Bar = 0.5 μm . (B) Grupo de bacterias dentro de una vacuola y bacterias extracelulares revelando una íntima asociación con la membrana celular. Bar = 0.5 μm . Tomado de Batterman *et al.*, 1995.

La formación del invasoma requiere de 24 a 48 horas y representa un proceso de tres pasos que es caracterizado por la adherencia inicial y la acumulación de decenas de bacterias en la superficie celular dando lugar a la agregación, seguido de la inmersión y finalmente, la internalización del agregado bacteriano por protrusiones de membrana (Batterman *et al.*, 1995; Dehio *et al.*, 1997; Rhomberg, 2007) (**Figuras 16 y 17**).

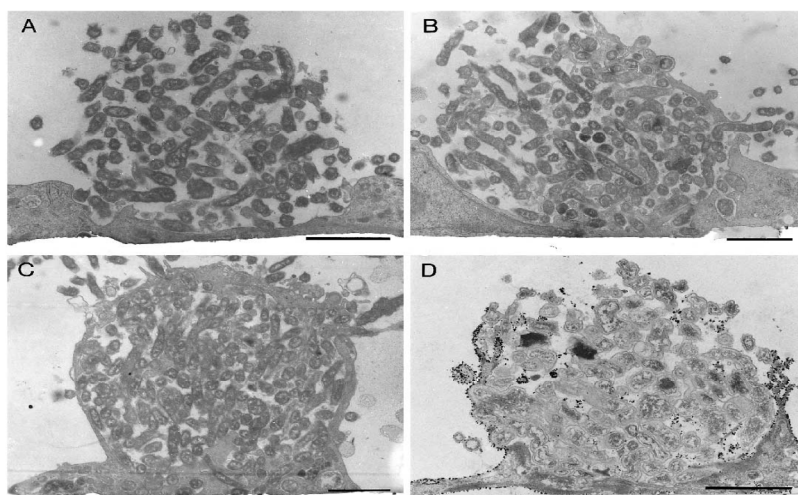


Figura 17. Análisis por TEM de invasión mediada por invasoma. HUVECS fueron infectadas por *B. henselae* cepa ATCC 49793 por 48 horas, lavadas y fijadas con formaldehído. La formación (A), inmersión (B y D) e internalización (C) de un agregado bacteriano representando secuencias en el proceso de invasión mediado por invasoma. Tomado de Dehio *et al.*, 1997.

2.2.5. Patogenicidad y Epidemiología

En Perú, se desconoce la incidencia y morbilidad de infecciones por *B. henselae*, sin embargo, las condiciones geográficas, estacionales y sociales, similares a los países vecinos que reportan estudios y casos de infección, son indicativos de que nuestro país reúne condiciones epidemiológicas necesarias para el desarrollo de la enfermedad. La interacción parásito-vector-huésped es cotidiano, favoreciendo la permanencia y multiplicación del patógeno en el medio.

Diversos estudios epidemiológicos revelan que la EAG es una enfermedad cosmopolita y estacional que afecta a la población mundial principalmente en los meses de otoño e invierno en las regiones de clima húmedo y cálido (Cané, 2009; Álvarez *et al.*, 2003). Los dueños de gatos infestados con pulgas tienen mayor predisposición a la EAG y la AB, afectando principalmente a niños y adultos jóvenes, con un pico de incidencia entre 2 a 14 años (Tappero *et al.*, 1993a). La AB también ha sido reportada en pacientes transplantados del corazón o riñón, en sometidos a quimioterapia, y eventualmente se ha reportado casos en pacientes aparentemente inmunocompetentes (Maguiña, 2001).

Estudios realizados en Argentina, Perú y Chile manifiestan también que la media de la edad coincide en 8.5 años (Cané, 2009). La AB por otra parte, constituye una enfermedad emergente que ha cobrado importancia como causa de morbilidad en pacientes infectados con VIH, sin embargo puede hallarse en individuos inmunocompetentes (Huarcaya *et al.*, 2003; Cané, 2009).

Los gatos cachorros, son la principal fuente de infección de *B. henselae*, por lo que evitar el contacto, arañazo, lametazo y/o mordedura de estos animales es lo más relevante para disminuir las estadísticas de la enfermedad (Álvarez *et al.*, 2003), siendo necesario el control de las pulgas para reducir o eliminar la transmisión

bacteriana entre gatos (CFSPH, 2005). El Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad Medicina Veterinaria de la Universidad de Illinois, reportó casos de perros con PH, teniendo como agente infeccioso a *B. henselae*. Estos resultados, pueden tener consecuencias zoonóticas potenciales de impacto en salud (Kitchel *et al.*, 2000).

Navarrete *et al.*, (2003), manifiestan que en una población de infectados con *B. henselae*, existe el contacto previo con gatos (90%) y de rasguño y/o mordedura (60%) y que además, el 10% tiene manifestaciones atípicas y 2% presenta complicaciones graves.

En el año 2003, el Instituto Nacional de Salud del Niño (Perú), reportó un caso de AB en un niño lactante (con SIDA), refiriendo también esta patología en niños con leucemia (con tratamiento quimioterápico), como también en pacientes inmunocompetentes (Torres *et al.*, 2003). En el año 2006, el Dr. Jorge Candela (de la misma institución) reportó a *B. henselae* como la cuarta causa de fiebre de origen desconocido (FOD) en dicho nosocomio (Polanco *et al.*, 2008).

En el 2008, el servicio de pediatría del Hospital Nacional Carlos Alberto Seguí Escobedo (HNCASE) EsSalud Arequipa-Perú, realizó el primer reporte de dos casos de enfermedad sistémica por arañazo de gato, forma atípica de presentación con fiebre prolongada que no respondió al tratamiento con antibióticos convencionales (Polanco *et al.*, 2008).

Huarcaya *et al.*, (2001), publicaron un estudio prospectivo y descriptivo transversal realizado en 30 pacientes, refiriendo 8 positivos para *B. henselae* por IFI, con títulos de 1/50 y 1/200 e histopatología. Los casos fueron confirmados posteriormente por PCR.

Desde que la EAG fue descrita en 1950, hubo un rápido incremento de casos en el mundo entero. Estados Unidos reporta aproximadamente, 40 000 casos de EAG por

año y 2000 hospitalizaciones (Jackson *et al.*, 1993; Cané, 2009) con una incidencia de 9,3 casos por 100 000 habitantes (Maurin & Raoult, 1998). El 80% de los afectados son niños con edades entre los 2 y 14 años (Zangwill *et al.*, 1993; Tappero *et al.*, 1993a). Se han reportado casos en casi todos los estados, especialmente en Florida, Texas, New York y San Francisco, áreas de alta prevalencia del VIH.

Chile realizó el primer diagnóstico de la EAG del gato en el año 1994 y dos años más tarde se publicaron los 10 primeros casos; actualmente reportan diversos casos y estudios clínicos y epidemiológicos, además de realizar investigación de la prevalencia en la población felina usando como material de diagnóstico Inmunofluorescencia Indirecta anti IgG entre otros métodos (Abarca, 1996; Zaror *et al.*, 2002; Ferrés *et al.*, 2006).

En diversas zonas de Brasil se cuentan con estudios de seroprevalencia donde los porcentajes llegan a ser 14% para *B. henselae* y 13% para *B. quintana* (Gonçalves da Costa, 2005). Los índices de seropositividad en estos casos, están cercanamente asociadas a la presencia de mascotas.

En Colombia, un estudio realizado en 80 pacientes procedentes de municipios con características sociodemográficas y referencia de síntomas, reveló una seroprevalencia de anticuerpos IgG anti-*Bartonella* de 48,7% (39/80) (*Bartonella sp.*) y para *B. henselae* la seropositividad fue de 30% (24/80) (Buelvas *et al.*, 2008).

Diferentes centros e institutos de Salud en España (Madrid) reportan a *B. henselae* como principal especie implicada en patologías humanas siendo una característica importante el hecho de que una misma especie pueda producir diferentes manifestaciones clínicas (García *et al.*, 2009).

2.3. Métodos de estudio

2.3.1. Cultivos celulares en líneas continuas

B. henselae, es un microorganismo intracelular facultativo capaz de infectar células endoteliales y eritrocitos tanto del reservorio felino como del hospedero humano accidental, siendo necesario usar sistemas basados en cultivos celulares que permitan la viabilidad y desarrollo del microorganismo para poder evidenciarlos y realizar estudios *in vitro* (Crespo, 2000; Rhomberg, 2007).

Blanco & Raoult (2006), sostienen que a diferencia de los métodos de cultivo convencionales, los medios de cultivo que emplean líneas celulares son más sensibles y que en ellos el crecimiento es más rápido. Otras literaturas también refieren que se pueden aislar especies de *Bartonella* en células endoteliales humanas u otros tipos celulares a partir muestras de sangre humana y biopsias (Koneman & Allen, 2008).

Las líneas celulares empleadas en el presente estudio, son células Vero ATCC y Hep-2 ATCC; la primera, derivada de riñón de mono verde africano y la segunda derivada de células humanas malignas (**Anexo 2**). Ambas tienen número variable de cromosomas por lo que también son denominadas líneas celulares heteroploides. Hay estudios que refieren que *B. henselae*, *in vitro*, al adherirse en células Hep-2, expresa fenotípicamente pilis del tipo IV que son esenciales para la patogenicidad de *B. henselae* (Batterman *et al.*, 1995).

En la metodología desarrollada para los cultivos de *B. henselae* cepa ATCC 49882 y para el aislamiento primario a partir de muestras de sangre total, se utilizó una monocapa celular adherido al lecho de un frasco de polipropileno, con medio EMEM con sustratos esenciales para su mantenimiento (aminoácidos y piruvato), más un suplemento de suero fetal bovino como factor promotor del crecimiento celular

(Crespo, 2000), pero existen otros medios definidos como es el RPMI 1640 que puede ser empleado con el mismo fin (Koneman & Allen, 2008).

La Scola & Raoult (1999), publicaron un estudio realizado en 2043 muestras de pacientes recibidas para cultivo de *Bartonella sp.* en el National Center for Rickettsiosis (EEUU), en dicha metodología de estudio refieren entre otros, el ensayo en líneas celulares por el método de *Shell Vial*. Los resultados del estudio fueron de 72 aislamientos para *B. quintana* y 8 para *B. henselae*. Los autores atribuyen los resultados como causa probable a la baja especificidad de los antisueros utilizados para la identificación por inmunofluorescencia.

Gouriet *et al.*, (2005), refieren haber inoculado 10 699 muestras humanas y 384 muestras animales en cultivos celulares en monocapa, usando el ensayo *Shell Vial*, con 5 diferentes protocolos desarrollados en su laboratorio. Del total, 2 619 muestras humanas y 297 muestras animales fueron inoculadas usando un protocolo para *Bartonella sp.* detectaron como positivos 88 muestras humanas y 47 muestras animales. Los investigadores manifiestan que el éxito de la técnica se basa en dos puntos críticos; primero, la proporción de microorganismos debe ser alto respecto a las células y segundo, que el sistema de microcultivo celular requiere centrifugación previa a la incubación.

La Scola & Raoult (1999), obtuvieron mayor número de aislamientos en *Shell Vial* a partir de muestras sanguíneas y en menor número a partir de otros tejidos. A partir de los datos obtenidos, concluyen en que no hay un procedimiento óptimo universal establecido para el aislamiento de *B. henselae* y *B. quintana*, sino más bien sugieren combinar técnicas y procedimientos que permitan el aislamiento de las especies de *Bartonella*.

2.3.2. Inmunofluorescencia Indirecta

La IFI es una metodología basada en la interacción antígeno/anticuerpo (detección de anticuerpos específicos IgG o IgM anti-*B. henselae*) que permite realizar el análisis serológico semicuantitativo, con una sensibilidad de 88-100% y una especificidad de 92-98% (Abarca *et al.*, 2013).

El centro para la prevención y control de enfermedades CDC Atlanta de E.U.A recomienda como el estándar de oro la IgG mediante inmunofluorescencia (IF) (Abarca *et al.*, 2013). Estudios realizados en dicho centro han estimado que títulos de IgG específico anti-*Bartonella henselae* iguales o mayores de 1/64 se correlacionan con enfermedad aguda, ya que se encuentran en más del 85% de los casos clínicos sintomáticos de EAG y solo en 3% de los controles sanos (Regnery *et al.*, 1992). Por ello consideran que la presencia de IgG anti-*Bartonella henselae* en título de 1/64 sin manifestaciones clínicas de EAG, indica exposición previa a la bacteria y es por tanto el nivel de corte usado para estudios de seroprevalencia (Ferres *et al.*, 2006); sin embargo, los estudios serológicos tienen algunas limitaciones, los títulos no ayudan mucho en los pacientes inmunosuprimidos ya que no producen adecuados anticuerpos (Maguiña, 2001). La EAG no confiere inmunidad prolongada, su recurrencia ha sido reportada en Estados Unidos de Norteamérica y Argentina (Álvarez *et al.*, 2003; Abarca, 2013).

Gouriet *et al.*, (2005), usando el ensayo de *Shell Vial* obtuvieron 88 aislamientos confirmados por IFI y coloración Giménez. La identificación a nivel de especie fue por PCR y secuenciamiento.

Pruebas serológicas de pacientes infectados por *B. henselae*, determinaron que tales sueros contenían regularmente anticuerpos específicos a BadA (70-80%), lo cual sugiere que BadA parece ser una proteína inmunodominante y este hallazgo puede

ser utilizado para mejorar los protocolos de laboratorio actuales para los enfoques de diagnóstico serológico (O'Rourke *et al.*, 2011).

Vásquez, *et al.*, (2007), afirman que la serología tiene una sensibilidad en el diagnóstico de EAG de 90% y en endocarditis bacteriana de 97%.

En Los Angeles (EEUU), un estudio de 200 sueros de personas indigentes reveló una seroprevalencia de anticuerpos contra *B. henselae* (9.5 %), *B. elizabethae* (13.6 %), y *B. quintana* (12.5 %) (Koneman & Allen, 2008).

Maurin *et al.*, (1994), realizaron el aislamiento de *B. quintana* a partir de una muestra de sangre de un paciente con SIDA. La caracterización y comparación por inmunofluorescencia la realizaron con cepas de referencia de *B. henselae*, *B. vinsonii* y *B. quintana*; emplearon sueros murinos específicos obtenidos por inmunización obteniendo alta sensibilidad y especificidad de los anticuerpos para las proteínas de las especies inoculadas. Concluyeron que la inmunofluorescencia con antisueros específicos (inmunoglobulina de cabra anti-ratón) permitió la identificación a nivel de especie del aislamiento primario. No hubo reacción cruzada. Sin embargo, La Scola & Raoult, (1999), manifiestan que al parecer, ciertos hospederos vertebrados "naturales", incluyendo al hombre y ciertos mamíferos pequeños no llegan a desarrollar una respuesta inmunológica a la bacteriemia por ciertas especies de *Bartonella*.

2.3.3. Coloración Giménez

McMullen y colaboradores (1986), sostienen que la técnica de coloración Giménez (1964), es un método sencillo, rápido y confiable. El trabajo experimental que realizaron con una bacteria Gram negativa, les permitió observar bacterias coloreadas de color magenta contra un fondo verde azulado (**Anexo 4A**).

En el presente trabajo, se busca optimizar el método de coloración Giménez para su empleo en la identificación de *Bartonella henselae* en cultivos celulares, considerando que es una bacteria intracelular que forma vacuolas o invasomas de infección como característica importante (Batterman, 1995).

2.3.4. Método *Shell Vial*

El método consiste en el empleo de ampollas o tubos de vidrio con tapas rosca, conteniendo una monocapa celular en un medio nutritivo líquido; dichas células serán inoculadas con una muestra conteniendo al microorganismo de interés y serán centrifugadas para acelerar la adherencia y la penetración del microorganismo a la célula receptora.

En sus inicios, el sistema de microcultivo centrifugado de células llamado *Shell Vial*, fue diseñado para el cultivo y aislamiento de citomegalovirus; esta herramienta hoy en día es una técnica comúnmente usada en virología y en laboratorios especializados (Hudson, *et al.*, 1976). Posteriormente, Marrero & Raoult, (1989) implementaron la técnica de *Shell vial* para el aislamiento de *Rickettsia* spp.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

El cultivo de *Bartonella henselae* en líneas celulares por el método de *Shell Vial*, permite realizar un mejor aislamiento a partir de muestras de sangre total de pacientes infectados.

3.2. Objetivo general

Estandarizar el aislamiento de *Bartonella henselae* en las líneas celulares Vero ATCC N° CCL-81 y Hep-2 ATCC N° CCL-23, utilizando el método de *Shell Vial*.

3.3. Objetivos específicos

- Determinar experimentalmente cuál de las dos líneas celulares empleadas para el aislamiento de *Bartonella henselae* es más susceptible a la infección.
- Determinar el tiempo de incubación óptimo para el aislamiento de *Bartonella henselae*.
- Determinar si la hemina es un factor esencial para la infección de las líneas celulares por *Bartonella henselae*.
- Optimizar el método de coloración Giménez para su empleo en la identificación de *Bartonella henselae* en cultivos celulares.
- Determinar la cantidad óptima de sangre total necesaria para la inoculación en las líneas celulares para el aislamiento de *Bartonella henselae*.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Material Biológico

- Sesenta muestras de sangre total de pacientes procedentes del sistema de vigilancia de febriles.
- Suero control polivalente detectable *Focus diagnostics* (positivo a *B. henselae*).
- Suero control polivalente no detectable *Focus diagnostics* (negativo a *B. henselae*).
- 02 sueros positivos a *Bartonella sp.* de pacientes procedentes del sistema de vigilancia de febriles (control positivo alto [1:256] y control positivo bajo [1:64])
- Conjugado anti-humano IgG producido en cabra ligado a isotiocianato de fluoresceína-FITC (SIGMA).
- **Cepa Patrón**
Bartonella henselae cepa ATCC 49882 Houston-1 [CIP 103737. G5436]
(Houston Texas, United States).
- **Líneas celulares continuas**
Vero ATCC N° CCL-81
Hep-2 ATCC N° CCL-23
Procedentes del Banco de células del CNPB del INS, sede Chorrillos-Lima-Perú.

4.2. Metodología

El presente estudio analítico- descriptivo, fue realizado durante los años 2011 y 2012, en el Área de Cultivo Celular del Laboratorio de Metaxénicas Bacterianas del CNSP-INS, empleando el método de aislamiento en *Shell Vial* descrito por Gouriet, *et al.*, (2005), quienes afirman que el aislamiento de microorganismos exigentes es posible

mediante el empleo de cultivos celulares y que el éxito de la técnica de aislamiento de dichos microorganismos por el método *Shell Vial* se basa en dos puntos críticos: en primer lugar, la relación del microorganismo respecto las células debería ser lo más alto posible y en segundo lugar, la centrifugación para facilitar la adherencia de los microorganismos intracelulares a las células receptoras.

Las actividades se desarrollaron en dos etapas: en la primera, se estandarizó la técnica de aislamiento en *Shell Vial* de *Bartonella henselae* cepa ATCC 49882 (**Anexo 1**) en dos líneas celulares continuas, Vero ATCC N° CCL-81 y Hep-2 ATCC N° CCL-23 (**Anexo 2**); en la segunda etapa se realizó el aislamiento primario a partir de muestras de sangre total procedentes del sistema de vigilancia de las enfermedades febriles a nivel nacional (INS-CNSP). Todos los procesos fueron desarrollados en condiciones de esterilidad y bioseguridad que corresponde a un laboratorio nivel II.

4.2.1. Actividades de la etapa I

Las actividades concernientes a la estandarización de la técnica de aislamiento de *Bartonella henselae* cepa ATCC 49882 en dos líneas celulares por el método de *Shell Vial* fueron varias. La **Figura 18** resume las actividades concernientes a esta etapa.

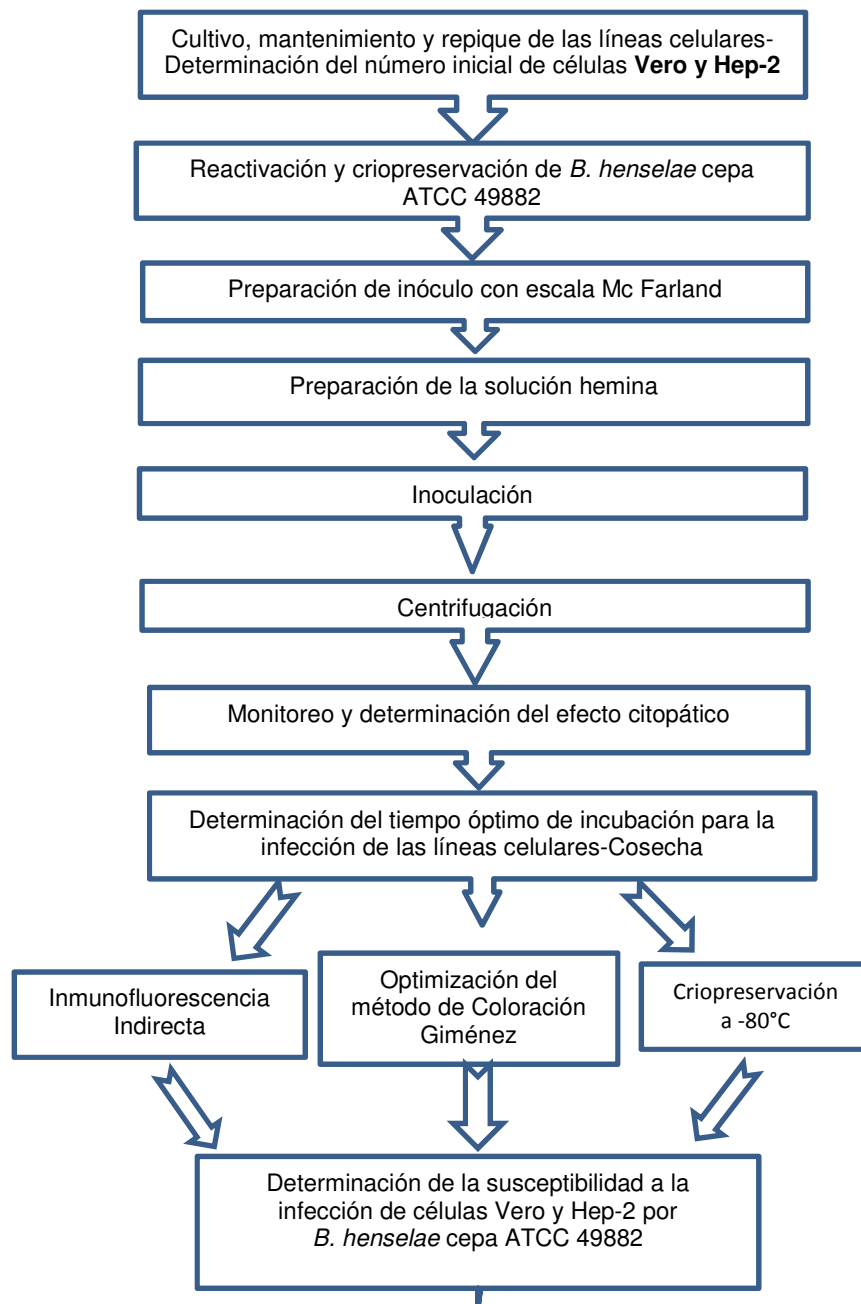


Figura 18. Resumen de las actividades realizadas para la estandarización de la técnica de *Shell Vial* para el aislamiento de *B. henselae* cepa ATCC 49882 en líneas celulares Vero ATCC y Hep-2 ATCC.

A. Cultivo celular, mantenimiento y repique de las líneas celulares:

Las líneas celulares Vero ATCC N° CCL-81 y Hep-2 ATCC N° CCL-23, fueron cultivadas en medio Eagle mínimo esencial (EMEM) como medio de crecimiento, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SBF), más antibiótico (Penicilina y Streptomycin) y antimicótico (Fungizona) GIBCO (100X), en frascos de cultivo de polipropileno BD Falcon y *Shell Viales* de vidrio de 10 mm de diámetro (tapa rosca) e incubadas a 37°C (**Figura 19**).

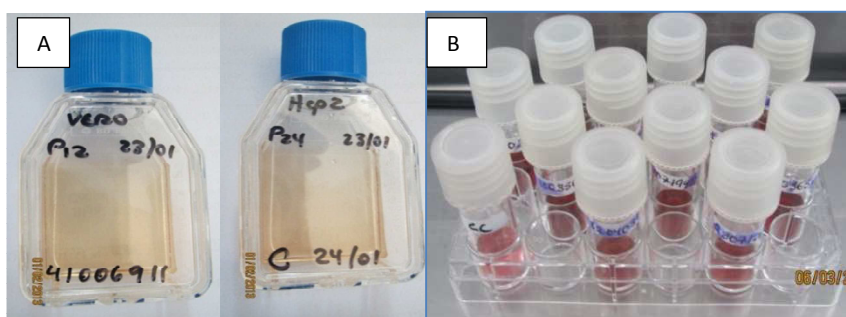


Figura 19. Cultivos celulares en medio de crecimiento. (A) En frascos de polipropileno con células Vero y Hep-2. (B) *Shell viales* de vidrio con tapa rosca.

El repique de las células a partir de monocapas celulares (con 95-100% de confluencia), fueron tratadas con 3 ml de tripsina (en concentración 1X), homogenizadas y contabilizadas en cámara Neubauer para su distribución en los *Shell Viales*.

B. Determinación del número inicial de células Vero y Hep-2

Los ensayos para la determinación del número inicial de células por mililitro (volumen inicial) para lograr una confluencia celular óptima en monocapa del 70-80% y la optimización del tiempo de incubación a 37°C, para la inoculación con cepa patrón, fue desarrollado simultáneamente para ambas líneas celulares en las mismas condiciones experimentales, con seis repeticiones para cada línea para los tiempos establecidos en 24, 48 y 72 horas (**Tablas 3 y 4**). Todo el procedimiento relacionado al manejo de

células y la cepa bacteriana, fue realizado dentro de una campana de flujo laminar LABCONCO clase II.

Se ensayaron 04 diluciones diferentes: 0.5×10^5 cél/ml, 1×10^5 cél/ml, 2×10^5 cél/ml y 3×10^5 cél/ml. El conteo fue realizado en cámara Neubauer, en las cuadrículas rosadas, cuya área es de 1 mm^2 (**Figura 20**), usando un microscopio invertido con campo claro marca Carl ZEISS modelo AXIOVERT 40C.

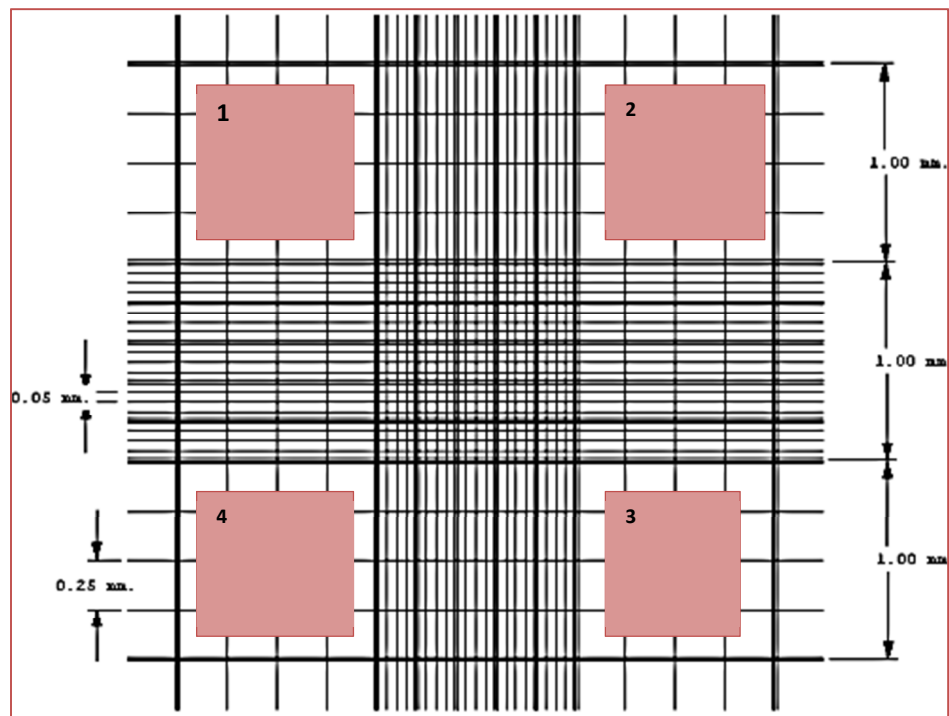


Figura 20. Cámara Neubauer mostrando los 4 cuadrantes del conteo (color rosado). El área correspondiente de dichas cuadrículas es de 1 mm^2 .

La fórmula empleada para hallar la concentración inicial fue la siguiente:

$\frac{\text{Total células contadas}}{\text{N° de cuadrantes}}$	\times	$\text{Factor de conversión (Cámara Neubauer)}$	\times	$\text{Factor de dilución*}$	$=$	N° cél/ml
---	----------	---	----------	------------------------------	-----	--------------------

*100 ul de concentrado celular fue diluido en 900 ul de PBS 1x

Factor de conversión = 10 000 (para el área 1 mm²)

Factor de dilución = 1:10

Ejemplo:

Total de células en los 4 cuadrantes = 80 células

Factor de dilución = 1:10

Factor de conversión = 10 000

Reemplazando:

$$\frac{80}{4} \times 1 \times 10^4 \times \frac{10}{1} = 20 \times 10^5 \text{ cél/ml} = C_i$$

Llevando C_i a la siguiente fórmula:

$$(C_i) \times (V_i) = (C_f) \times (V_f)$$

Dónde:

C_i = Concentración inicial (20×10^5 cél/ml)

C_f = Concentración final requerida: 1×10^5 cél/ml

V_i = Volumen inicial (concentrado celular)

V_f = Volumen final (Ej. 50 ml)

Reemplazando valores en la fórmula:

$$20 \times 10^5 \text{ cél/ml} \times V_i = 1 \times 10^5 \text{ cél/ml} \times 50 \text{ ml}$$

$$V_i = 2.5 \text{ ml}$$

Finalmente, 2.5 ml es el volumen inicial de concentrado celular necesario para preparar un volumen final de 50 ml de suspensión celular en concentración 1×10^5 cél/ml.

C. Reactivación y criopreservación de *B. henselae* cepa ATCC 49882

La reactivación se realizó en el Área de *Bartonellosis* del Laboratorio de Metaxénicas Bacterianas del CNSP-INS, en condiciones de bioseguridad establecidas para un laboratorio nivel II.

La cepa liofilizada de *B. henselae* ATCC 49882, fue reconstituida en suero fisiológico e inoculada en medio bifásico de Agar Columbia suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 10% como fase sólida y EMEM SFB 5% como fase líquida, en frasco de 12.5 cc (**Anexo 3C**), e incubado a 37°C por 5 días en condiciones de microaerofilia (campana de anaerobiosis-método de la vela). El crecimiento fue monitoreado diariamente hasta visualizar colonias características (**Figura 21**). En seguida, las colonias de 5 días de crecimiento fueron homogenizadas suavemente en la fase líquida del medio bifásico y fueron traspasadas (0.5 ml empleando una jeringa estéril de 1 ml) en placas de Agar Columbia suplementado con 10% de sangre de carnero desfibrinada. Las placas fueron incubadas en condiciones de microaerofilia (campana de anaerobiosis-Método de la vela) a 37°C por 5 días hasta visualizar colonias características. Dichas colonias de 5 días de crecimiento, fueron cosechadas y destinadas a dos usos, criopreservación en caldo BHI con 10% de glicerol para reactivaciones posteriores e inoculación en líneas celulares empleando el método de suspensión de colonias (Picazo *et al.*, 2000).

Con fines de evitar daño celular de la cepa patrón debido a la formación de cristales, el proceso de criopreservación se desarrolló en dos pasos: a -20°C por 24 horas y a -80°C por tiempo indefinido.



Figura 21. Colonias características de *B.henselae* cepa ATCC 49882 en medio bifásico de Agar Columbia suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 10% (fase sólida) y EMEM 5% SFB (fase líquida).

D. Preparación del inóculo con escala Mc Farland por el Método de suspensión directa de colonias

Para determinar la concentración inicial de *Bartonella henselae* cepa ATCC 49882 de 5 días de crecimiento, se siguió las recomendaciones de Picazo *et al.*, (2000), que consiste en homogenizar las colonias en PBS pH 7.2 y ajustarlas a una turbidez equivalente a 0.5 de la escala de Mc Farland (10^8 UFC/ml), procediéndose inmediatamente a la inoculación.

E. Determinación de la susceptibilidad a la infección de las líneas celulares Vero y Hep-2 por *Bartonella henselae* cepa ATCC 49882

El aislamiento de la bacteria de interés en un tiempo determinado empleando hemina como suplemento nutritivo para determinar la susceptibilidad a la infección fue evaluado por visualización del efecto citopático, la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la coloración Giménez. Dicha determinación comprendió puntos desarrollados a continuación.

F. Preparación de la solución de hemina

Para preparar esta solución se siguió las recomendaciones de Del Valle (2002). Se preparó una solución madre de concentración 5 mmol/L de la siguiente manera: 32.5 mg de Hemina bovina (SIGMA, H 3505 Lot 16H1331) fueron disueltos en 0.5 ml de NaOH 1 N por 30 minutos; la mezcla fue neutralizada con 0.5 ml de HCl 1 N, se le añadió 0.5 ml de solución de Tris base 2-[Amino-2(hydroxymethyl)-1] de 0.5 mol/L y se llevó a un volumen final de 10 ml con medio EMEM suero bovino fetal al 10%. La solución fue filtrada (0.22 µm) y almacenada a 4 °C, en frasco tapa rosca de color ámbar. Todo el proceso se llevó a cabo en esterilidad y en cabina de bioseguridad.

G. Inoculación

Se preparó frascos de cultivo de 12.5 cc y 75 cc, y *Shell viales*, con 70-80 % de confluencia en monocapa, de células Vero y Hep-2, en medio de mantenimiento EMEM 5% SFB sin antibiótico ni antimicótico (Myers *et al.*, 1969; Gouriet *et al.*, 2005).

Bartonella henselae cepa ATCC 49882 fue ajustado a una turbidez equivalente de 0.5 de la escala Mac Farland e inoculado en los cultivos celulares limpios (lavados con PBS pH 7.2) en las siguientes cantidades: 500 µl en frascos de 75 cc, 200 µl en los frascos de 12.5 cc y 50 µl en *Shell Viales* respectivamente (**Figura 22**). Las inoculaciones fueron centrifugadas a 700g/15 minutos e incubadas a 37°C por 30 minutos, luego, se adicionó medio EMEM 5% SBF sin antibiótico ni antimicótico suplementado con 15 µl de solución hemina por mililitro de medio de mantenimiento (Schwartzman *et al.*, 1993). Simultáneamente y en las mismas condiciones experimentales se inoculó un segundo grupo de células pero sin el suplemento hemina. Los controles negativos fueron procesados simultáneamente en las mismas condiciones para ambos grupos (con hemina y sin hemina). Todos los cultivos fueron incubados a 37°C en condiciones de microaerofilia por 5, 7, 9, 12, 15, 17 y 20 días.

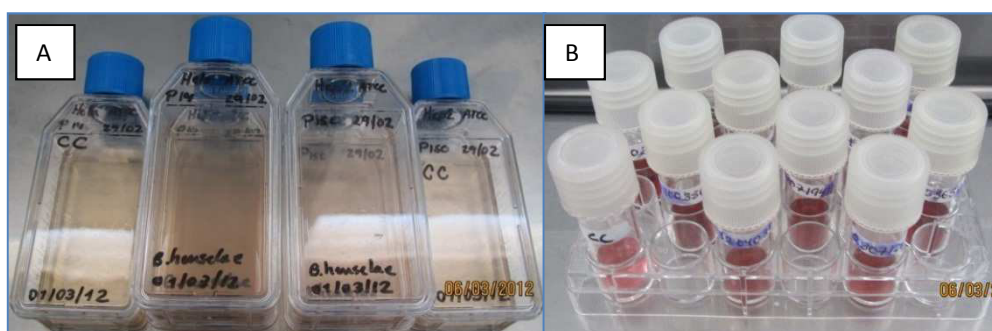


Figura 22. Cultivos de células Vero y Hep-2 inoculados con *Bartonella henselae* cepa ATCC 49882 (A) en frascos de polipropileno (B) en *Shell Viales* de vidrio.

H. Monitoreo y determinación del efecto citopático de células Vero y Hep-2

Los cultivos fueron monitoreados diariamente al microscopio de luz invertido con campo claro y campo oscuro con aumentos de 50x, 100x y 200x (Carl Zeiss-AXIOVERT 40C) con la finalidad observar la viabilidad celular y detectar el efecto citopático de las líneas celulares (ECP) por infección con *B. henselae* cepa ATCC 49882 que consistió en la formación de estructuras densas (zonas hiperpigmentadas) a modo de granulaciones en la zona perinuclear. Así mismo, se realizó la observación macroscópica de forma acuciosa para detectar signos visibles de contaminación, desprendimiento celular, alcalinización o acidificación del medio. El ECP fue verificado mediante IFI y coloración Giménez.

I. Cosecha y determinación del tiempo óptimo de incubación para el aislamiento de *B. henselae* cepa ATCC 49882.

Transcurrido el tiempo de incubación para los días a evaluar (5, 7, 9, 12, 15, 17 y 20 días), se procedió a la cosecha (en condiciones de esterilidad y bioseguridad establecidos para el laboratorio).

El desprendimiento de la monocapa celular se realizó con el uso de un raspador celular en el caso de los cultivos en frasco, y con puntas de 1000 µl en el caso de los *Shell vial*. Luego, las células cosechadas fueron concentradas por centrifugación a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C (en centrífuga refrigerada Marca EPPENDORF modelo 5417R), se descartó el sobrenadante y las células fueron lavadas con PBS pH 7.2.

El concentrado celular fue destinado a tres procesos: i) criopreservación (en Sacarosa-fosfato-glutamato [SPG] en proporción 1:1 con PBS pH 7.2), ii) impregnación en láminas para inmunofluorescencia indirecta (IFI), iii) impregnación en láminas para coloración Giménez. Este protocolo fue desarrollado para cada uno de los tiempos a evaluar.

J. Criopreservación de las cosechas

Empleando la metodología descrita en el manual de Procedimientos de Rickettsiosis del laboratorio, se procedió a criopreservar (volumen: volumen) 500 µl de suspensión celular de cada cosecha, con 500 µl de SPG. La criopreservación fue ejecutada en dos tiempos: a -20°C por 24 horas y a -80°C por tiempo indefinido, guardado en los congeladores de la seroteca de CNSP-INS, con la finalidad de reactivaciones y estudios posteriores.

K. Inmunofluorescencia Indirecta

La producción del antígeno para la prueba de IFI, fueron elaboradas con las cosechas de los cultivos celulares infectados con *Bartonella henselae* cepa ATCC 49882, siguiendo el protocolo descrito por Gouriet *et al.*, (2005). Para ello, las láminas de 12 pocillos fueron impregnadas con células Vero y Hep-2 infectadas con la cepa patrón, procedentes de cada uno de los tiempos a evaluar (5, 7, 9, 12, 15, 17, y 20 días de incubación). Las láminas fueron fijadas con acetona fría por 20 minutos y secadas a temperatura ambiente. Para la prueba se utilizaron sueros polivalentes comerciales positivo y negativo de *B. henselae* (FOCUS DIAGNOSTICS) y conjugado anti-humano

IgG marcado con fluoresceína (SIGMA, F35212, 101M4822), con título 1:100. Además, se tituló sueros procedentes del sistema de vigilancia de febriles con códigos 020188311 y 030235412 (control positivo alto y control positivo bajo respectivamente), correspondientes a aislamientos positivos de *B. bacilliformis* y negativas a Rickettsiosis, siendo los títulos obtenidos 1/64 y 1/256 respectivamente.

Según el protocolo de trabajo para la prueba IFI, el valor de corte establecido fue de 1:64 tanto para los sueros comerciales control polivalente detectable y no detectable, así como para los sueros titulados positivo alto y positivo bajo. Es decir, 2 µl de cada uno de estos sueros fueron diluidos con 126 µl de diluyente (solución de leche descremada al 3% en 10 ml PBS pH 7.3). 10 µl de estas diluciones fueron dispensadas en cada uno de los pocillos de las láminas IFI e incubadas a 37°C por 30 minutos en cámara húmeda; se procedió al lavado por tres veces con PBS pH 7.3 empleando un coplin (en agitación) por 10 minutos para cada etapa de lavado; se dejó secar las láminas a 37°C por 5 minutos. En seguida, se preparó el conjugado anti-humano IgG marcado con fluoresceína* a dilución 1/100 con Azul de Evans como colorante de contraste y se dispensó 10 µl en cada pocillo. Se incubó por 30 minutos a 37°C, en cámara húmeda. Se procedió a los lavados y secado como en el paso anterior. Las láminas fueron finalmente montadas en glicerol para la lectura al microscopio de epifluorescencia con 400x de resolución. El procedimiento fue realizado simultáneamente para los sueros comerciales y los sueros positivos y negativos titulados del sistema de vigilancia, (**Figura 23**).

*(10 µl de conjugado diluido en 985 µl PBS más 5 µl de Azul de Evans)

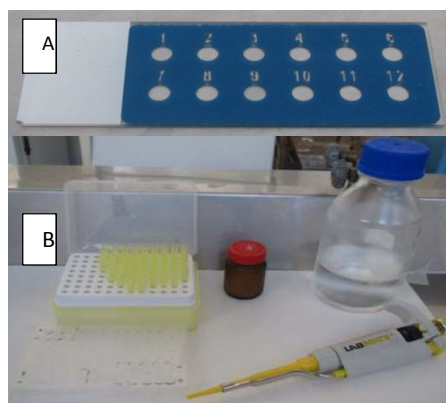


Figura 23. (A) Lámina para IFI, (B) Material complementario para la IFI

L. Optimización del Método de Coloración Giménez

Las láminas para coloración, impregnadas con células cosechadas para los diferentes tiempos a evaluar, constaron de células infectadas y células no infectadas (control), y fueron procesadas según protocolo establecido por Giménez (1964), (**Anexo 4**). Esta coloración de contraste emplea un colorante ácido como es la Carbol fucsina y un colorante básico como es el Verde de Malaquita aplicado en 2 repeticiones de 15-20 segundos, siendo lo esperado observar bacterias coloreadas de color fucsia contra un fondo azul verdoso.

La optimización de la coloración Giménez consistió en emplear 5 tiempos diferentes de coloración de contraste con verde de Malaquita (2, 5, 10, 15 y 20 segundos) para determinar el tiempo óptimo de coloración de contraste y así determinar la presencia o ausencia de *B. henselae* en los cultivos celulares, discriminando propiamente las bacterias intracelulares de otros componentes e inclusiones propios de las células, considerando la densidad óptica de las mismas en el momento de la observación al microscopio. La evaluación se realizó mediante observación al microscopio con 400x y 1000x de resolución.

4.2.2. Actividades de la etapa II

Culminada la estandarización de la técnica para el aislamiento de *Bartonella henselae* cepa ATCC 49882 en células Vero ATCC N° CCL-81 y Hep-2 ATCC N° CCL-23 por el método de *Shell Vial*, se procedió al aislamiento primario de *B. henselae* a partir de muestras de sangre total seleccionadas para el presente estudio empleando la metodología descrita y estandarizada en la etapa I. La **Figura 24** resume las actividades concernientes al procesamiento de muestras.

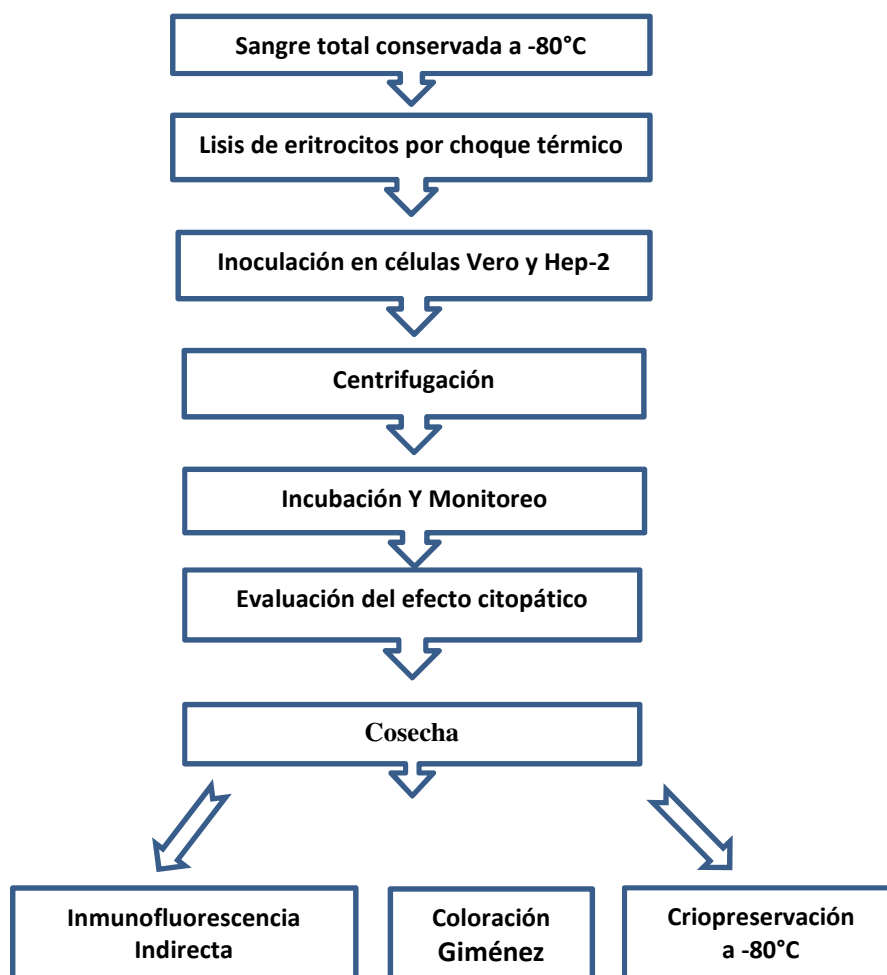


Figura 24. Resumen de las actividades realizadas en la etapa II

A. Área de estudio

Para realizar el aislamiento primario de *Bartonella henselae*, se obtuvieron muestras de sangre total procedentes del sistema de vigilancia de febriles que se aplica en el INS de muestras procedentes a nivel nacional. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en el área de Rickettsiosis-Cultivo celular del Laboratorio de Metaxénicas Bacterianas del CNSP-INS, Lima-Perú.

B. Población de estudio y tamaño muestral

Se seleccionó 60 muestras de sangre total con sospecha clínica y epidemiológica de infección por *Bartonella henselae*, de las muestras obtenidas en recepción y obtención de Muestra (ROM) del CNSP-INS con el propósito de la vigilancia de las enfermedades febriles metaxénicas, procedentes de las diferentes regiones del país (según la norma técnica NT N° 001-MINSA / DGSP- V.01 (2003) y realizadas de acuerdo a las recomendaciones del MINSA- INS, (2002).

C. Criterios de inclusión y exclusión

Entre todas las muestras de sangre total con anticoagulante, que se destinaron al laboratorio de Metaxénicas Bacterianas, fueron seleccionadas aquellas que conservaban características propias de sangre total en óptimas condiciones (criterios de inclusión), excluyendo las que resultaron positivas a Rickettsiosis y/o la Enfermedad de Carrión, además de las que se encontraban en mal estado de conservación (criterios de exclusión).

D. Procesamiento de muestras

La técnica empleada fue la de centrifugación en *Shell Vial*, descrita para la cepa patrón (Gouriet *et al.*, 2005) en la etapa I.

Las 60 muestras de sangre total con anticoagulante, fueron congeladas a -80°C por 24 horas; lisadas por choque térmico a 38°C ; homogenizadas y sedimentadas por media hora. Se tomó 20 μl del sobrenadante y se inoculó en las líneas celulares Vero y Hep-2 en *Shell Viales* previamente codificados. El medio de mantenimiento empleado (1 ml por cada *Shell Vial*) fue EMEM con 5% de SBF, sin antibiótico ni antimicótico. Cada línea celular fue inoculada por triplicado, centrifugadas a 700g/15 minutos e incubada a 37°C en microaerofilia por 12 días. Las cosechas fueron centrifugadas a 5000 rpm/5 minutos a 4°C , lavadas con PBS pH 7.2 y destinadas a la criopreservación, la prueba IFI y coloración Giménez.

(Figura 25).

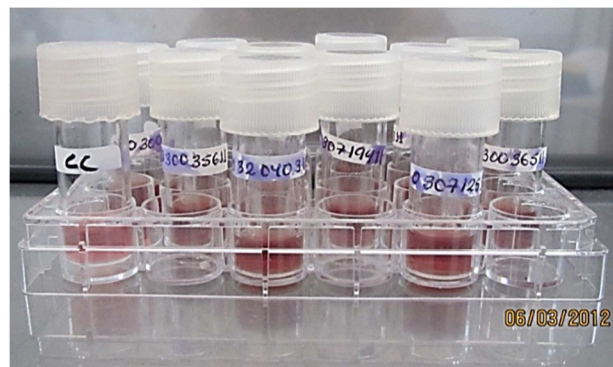


Figura 25. *Shell viales* inoculados con muestras de sangre total.

5. RESULTADOS

5.1 Resultados de la etapa I

Estandarizar la prueba de aislamiento para *Bartonella henselae* cepa ATCC 49882 en dos líneas celulares utilizando el método de Shell Vial en células Vero y Hep-2, determinó diversos parámetros. Varios factores críticos tuvieron que ser considerados durante la estandarización del proceso. Uno de ellos fue el porcentaje de desarrollo de los cultivos para la inoculación, para ello se requirió realizar ajustes en las concentraciones iniciales hasta llegar a una optimización, lo que permitió la viabilidad celular hasta los 12 días de incubación tanto para aislamiento de la cepa patrón como para el aislamiento primario. Tiempos mayores a 12 días fueron desfavorables, evidenciando desprendimiento acelerado de la monocapa celular por agotamiento de nutrientes y acidificación del medio de mantenimiento.

5.1.1 Número Inicial de Células

Se determinó la concentración inicial óptima de células Vero y Hep-2, en 1×10^5 cel/ml, para obtener una monocapa de células viables con 70-80% de confluencia en 24 horas de incubación a 37°C, para la inoculación con *B. henselae* cepa ATCC 49882 (**Figura 26**). Las **Tablas 3 y 4** muestran los resultados obtenidos para las cuatro concentraciones ensayadas (0.5×10^5 cel/ml, 1×10^5 cel/ml, 2×10^5 cel/ml y 3×10^5 cel/ml) en tres tiempos diferentes (24, 48 y 72 horas).

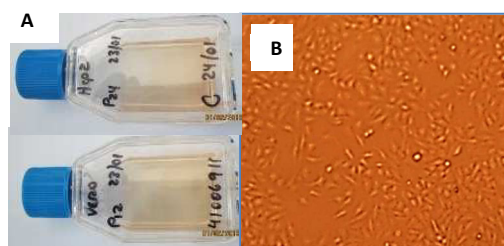


Figura 26. (A) Frascos con volumen inicial en concentración 1×10^5 cel/ml para una confluencia en monocapa del 70-80% en 24 horas a 37°C. **(B)** Monocapa celular con 70-80% confluencia, visto al microscopio invertido en campo claro Carl ZEISS, AXIOVERT 40C. Aumento 100x.

Tabla 3. Registro de la confluencia en monocapa de células Vero en *Shell Vial*

Vial	Fecha	Concentración (células/ml)	Porcentaje de confluencia (%)			Optimización (horas)
			24 h	48 h	72 h	
1	14/06/2011	0.5x10 ⁵	35	70	100	Óptimo en 48h
2	14/06/2011	0.5x10 ⁵	35	70	100	Óptimo en 48h
3	14/06/2011	0.5x10 ⁵	35	70	100	Óptimo en 48h
4	14/06/2011	0.5x10 ⁵	40	80	100	Óptimo en 48h
5	14/06/2011	0.5x10 ⁵	40	80	100	Óptimo en 48h
6	14/06/2011	0.5x10 ⁵	35	70	100	Óptimo en 48h
1	14/06/2011	1x10⁵	70	100	100	Óptimo en 24h
2	14/06/2011	1x10⁵	75	100	100	Óptimo en 24h
3	14/06/2011	1x10⁵	75	100	100	Óptimo en 24h
4	14/06/2011	1x10⁵	75	100	100	Óptimo en 24h
5	14/06/2011	1x10⁵	70	100	100	Óptimo en 24h
6	14/06/2011	1x10⁵	70	100	100	Óptimo en 24h
1	14/06/2011	2x10 ⁵	100	*	*	No apto en 24h
2	14/06/2011	2x10 ⁵	100	*	*	No apto en 24h
3	14/06/2011	2x10 ⁵	100	*	*	No apto en 24h
4	14/06/2011	2x10 ⁵	100	*	*	No apto en 24h
5	14/06/2011	2x10 ⁵	100	*	*	No apto en 24h
6	14/06/2011	2x10 ⁵	100	*	*	No apto en 24h
1	14/06/2011	3x10 ⁵	**	**	**	No apto en 24h
2	14/06/2011	3x10 ⁵	**	**	**	No apto en 24h
3	14/06/2011	3x10 ⁵	**	**	**	No apto en 24h
4	14/06/2011	3x10 ⁵	**	**	**	No apto en 24h
5	14/06/2011	3x10 ⁵	**	**	**	No apto en 24h
6	14/06/2011	3x10 ⁵	**	**	**	No apto en 24h

* Células conglomeradas en racimo.

** Células levantadas.

Tabla 4. Registro de la confluencia en monocapa de células Hep-2 en *Shell Vial*

Vial	Fecha	Concentración células/ml	Porcentaje de confluencia (%)			Optimización (horas)
			24 h	48 h	72 h	
1	14/06/2011	0.5x10 ⁵	40	80	100	Óptimo en 48h
2	14/06/2011	0.5x10 ⁵	40	80	100	Óptimo en 48h
3	14/06/2011	0.5x10 ⁵	35	80	100	Óptimo en 48h
4	14/06/2011	0.5x10 ⁵	35	80	100	Óptimo en 48h
5	14/06/2011	0.5x10 ⁵	40	80	100	Óptimo en 48h
6	14/06/2011	0.5x10 ⁵	35	80	100	Óptimo en 48h
1	14/06/2011	1x10⁵	80	100	100	Óptimo en 24h
2	14/06/2011	1x10⁵	80	100	100	Óptimo en 24h
3	14/06/2011	1x10⁵	80	100	100	Óptimo en 24h
4	14/06/2011	1x10⁵	75	100	100	Óptimo en 24h
5	14/06/2011	1x10⁵	75	100	100	Óptimo en 24h
6	14/06/2011	1x10⁵	75	100	10	Óptimo en 24h
1	14/06/2011	2x10 ⁵	100	*	*	No apto en 24h
2	14/06/2011	2x10 ⁵	100	*	*	No apto en 24h
3	14/06/2011	2x10 ⁵	100	*	*	No apto en 24h
4	14/06/2011	2x10 ⁵	100	*	*	No apto en 24h
5	14/06/2011	2x10 ⁵	100	*	*	No apto en 24h
6	14/06/2011	2x10 ⁵	100	*	*	No apto en 24h
1	14/06/2011	3x10 ⁵	**	**	**	No apto en 24h
2	14/06/2011	3x10 ⁵	**	**	**	No apto en 24h
3	14/06/2011	3x10 ⁵	**	**	**	No apto en 24h
4	14/06/2011	3x10 ⁵	**	**	**	No apto en 24h
5	14/06/2011	3x10 ⁵	**	**	**	No apto en 24h
6	14/06/2011	3x10 ⁵	**	**	**	No apto en 24h

*Células conglomeradas en racimo.

** Células levantadas.

5.1.2 Concentración de Inóculo

Las colonias fueron cosechadas, homogenizadas y ajustadas a una turbidez equivalente de 0.5 de la escala Mac Farland, e inoculado en las siguientes cantidades: 500 μ l para los frascos de 75 cc, 200 μ l para los frascos de 12.5 cc y 50 μ l para los *Shell Vials*. Los ensayos con cantidades menores de inóculo a lo indicado, revelaron muy baja infección; ensayos con cantidades mayores, mostraron efecto citotóxico desencadenando muerte celular prematura a las 24 horas de incubación con levantamiento total de la monocapa celular y acidificación del medio de mantenimiento (**Figura 27**).

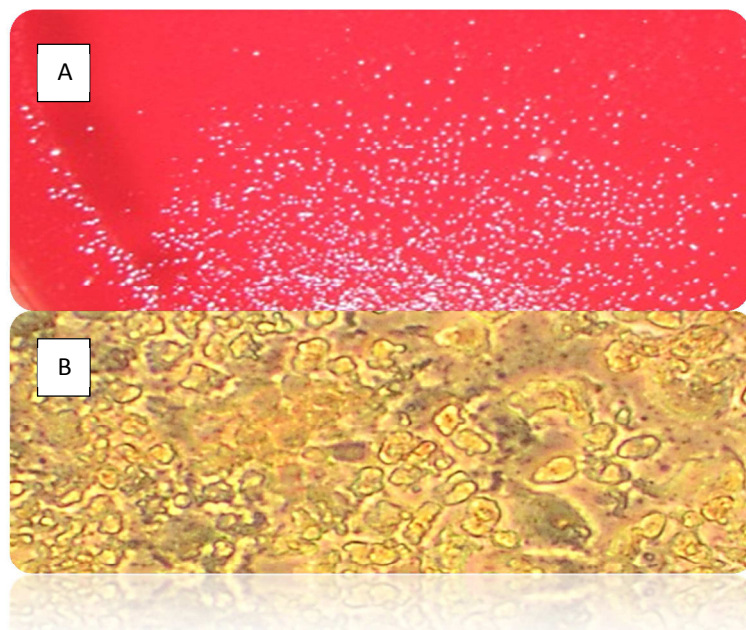


Figura 27. (A) *B. henselae* cepa ATCC 49882, en Agar Columbia suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 10%, mostrando un cultivo en placa de 5 días de crecimiento a 37°C. Se observan colonias características para la preparación de los inóculos de frascos y *Shell Viales* **(B)** Células levantadas evidenciando efecto citotóxico. 400x

5.1.3 Determinación del tiempo óptimo de incubación

Las células Vero y Hep-2 inoculadas con *B. henselae* cepa ATCC 49882 e incubadas en medio de mantenimiento EMEM 5% SBF suplementado con 15 µl de hemina por mililitro de medio de mantenimiento, evidenciaron periodos cortos de infección a partir del 9^{no} día de incubación, alcanzando el mayor número de células infectadas al 12^{avo} día (192 infectadas de 650 células Vero y 424 de 625 células Hep-2) (**Tabla 6**), determinándose así el tiempo óptimo de incubación para la infección de las células (**Tabla 5**). Los resultados fueron confirmados mediante pruebas IFI (prueba de oro) (**Figuras 28, 29**), efecto citopático (**Figura 30**) y coloración Giménez (**Figura 32**), confirmando de esta manera que las líneas celulares Vero y Hep-2 son susceptibles a la infección por *B. henselae* cepa ATCC 49882.

Tabla 5. Número de días necesarios para obtener el mayor número de infección

Número de días de incubación	IFI		C. GIMENEZ		ECP	
	Vero	Hep-2	Vero	Hep-2	Vero	Hep-2
5	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	+	+
12	++	++	++	++	++	++
15	Cultivos inviables con desprendimiento de la monocapa celular y lisis progresiva a partir del 15 ^{avo} día, mucho más acentuado en células Hep-2.					
17						
20						

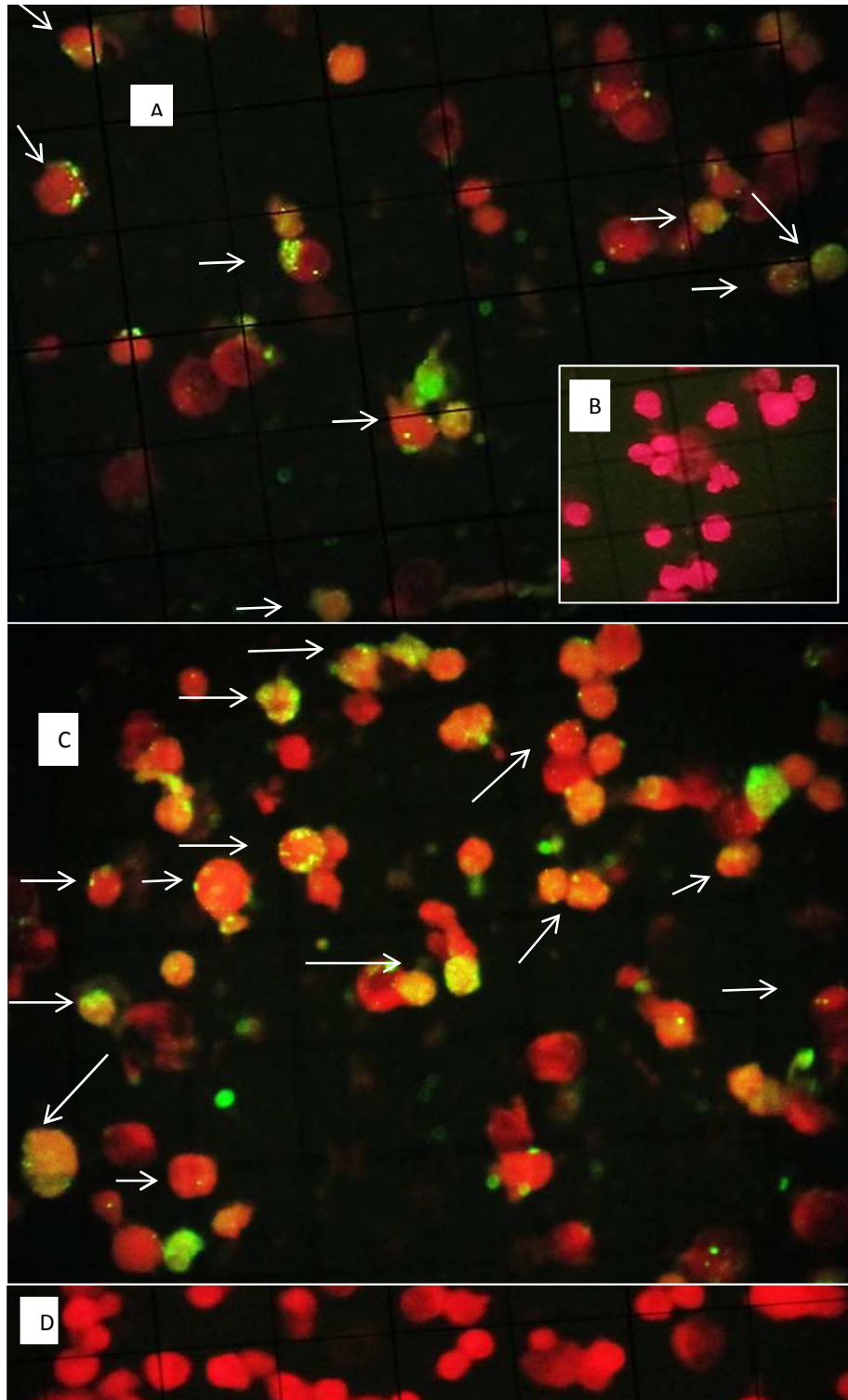


Figura 28. IFI, las flechas señalan a células infectadas con *B. henselae* cepa ATCC 49882, mostrando coloración verde manzana característica: **(A)** Células Vero infectadas, **(B)** células Vero, control negativo. **(C)** Células Hep-2 infectadas **(D)** Células Hep-2, control negativo. 400x

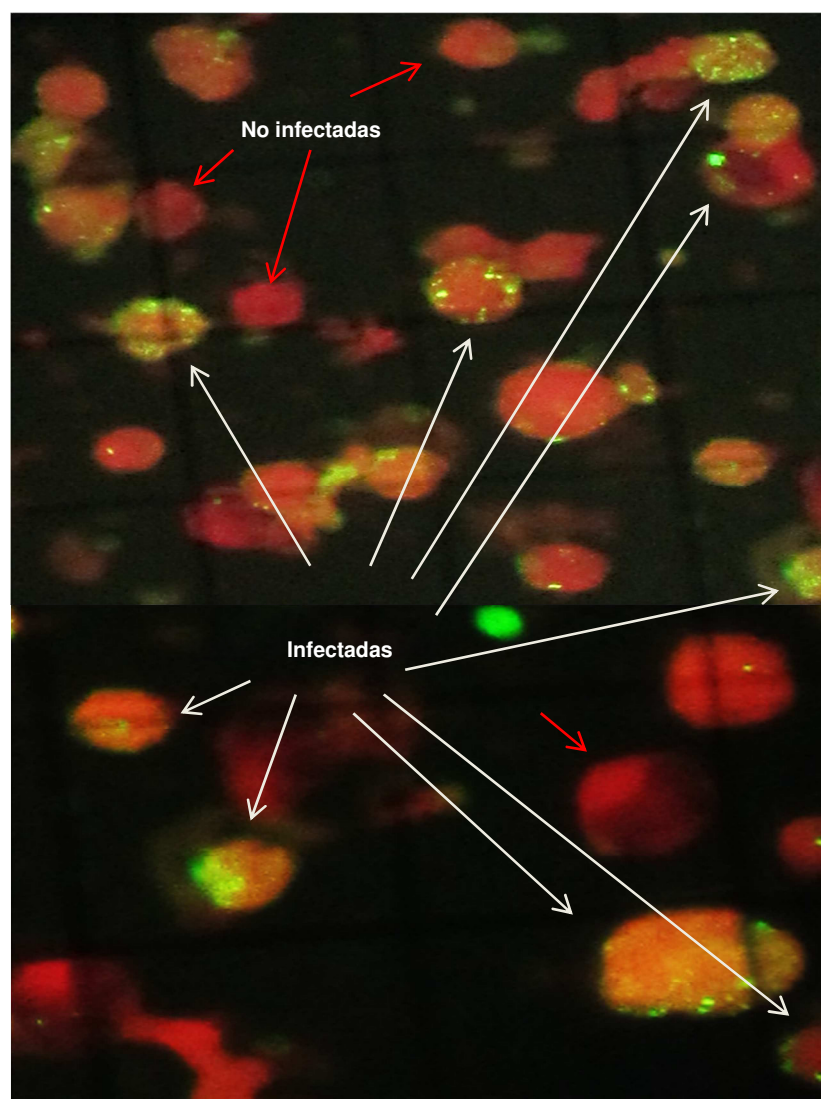


Figura 29. IFI-células Hep-2 mostrando células infectadas con *B. henselae* cepa ATCC 49882. Las flechas blancas señalan células infectadas y las rojas a las no infectadas. 400x.

Las células Vero y Hep-2 infectadas con *B. henselae* cepa ATCC 49882 en medio de mantenimiento EMEM 5% SBF, suplementado con hemina, fueron observadas al microscopio invertido con contraste de fase, aumento 400x, mostraron ECP evidenciando la presencia de agregados oscuros (hiperpigmentados) semejando granulaciones, con predominancia en la zona perinuclear. Estas estructuras corresponderían a invasomas o vacuolas de infección que corresponden a periodos cortos de infección a partir del noveno día, alcanzando el mayor número de células infectadas a los 12 días de incubación. Los resultados fueron evaluados mediante

pruebas de IFI, ECP y coloración Giménez (**Figuras 28,29, 30, 32**) permitiendo determinar el tiempo óptimo de incubación para la infección de las células.

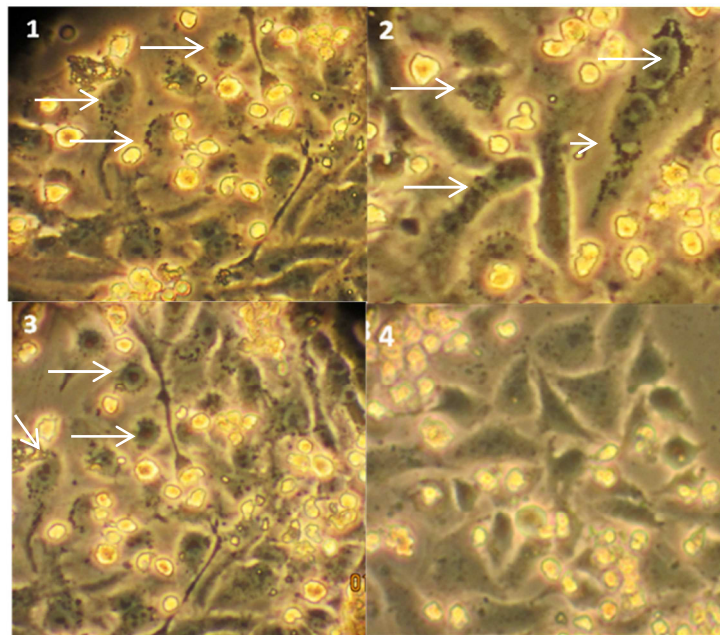


Figura 30. (1), (2), (3): ECP en células infectadas por *B. henselae* cepa ATCC 49882. Las flechas señalan invasomas a modo de granulaciones hiperpigmentadas en el citoplasma celular y zonas cercanas al núcleo. (4) Células control negativas sin ECP. 400x

Las células Vero y Hep-2 inoculadas con *B. henselae* cepa ATCC 49882 con medio EMEM 5% SBF **sin suplemento de hemina** y en las mismas condiciones experimentales de laboratorio, no evidenciaron ECP, fueron negativas a la IFI y a la coloración Giménez, demostrando ser negativas a la infección (**Figura 31**).

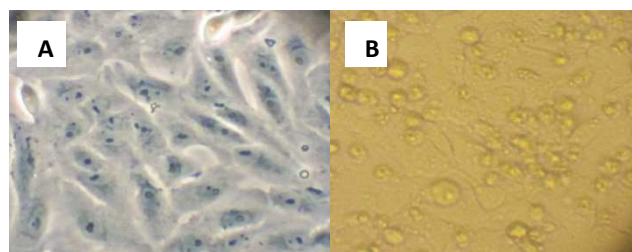


Figura 31. Células inoculadas con *B. henselae* cepa ATCC 49882 sin suplemento hemina. Las células no mostraron ECP y fueron negativas a la IFI y coloración Giménez. (**A**) en campo oscuro). (**B**) en campo claro.

5.1.4 Coloración Giménez

La optimización del método de coloración Giménez, consistió en disminuir el tiempo de contraste con verde de Malaquita a en las coloraciones de *B. henselae* en células Vero y Hep-2, ya que siguiendo el protocolo establecido por Giménez (1964) (**Anexo 4**), las lecturas al microscopio en el tiempo establecido no fueron óptimas. Los ensayos no permitieron buen contraste entre las formas bacterianas y componentes propios de las células Vero y Hep-2, generando dificultad en las lecturas al microscopio, éstas mostraron opacidad de los campos evaluados debido a la densidad propia de las células. Se determinó el tiempo de contraste con verde de Malaquita en 2 segundos por vez en lugar de 15-20 segundos establecidos en el protocolo original. Se observó a las células infectadas con zonas oscuras coloreadas entre fucsia y violeta con fondo verde azulado tenue (**Figura 32**).

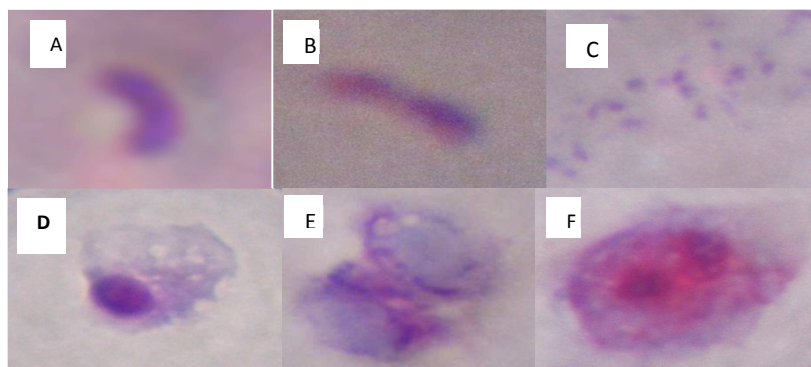


Figura 32. Coloración Giménez de *B. henselae* cepa ATCC 49882. Parte superior: (A) y (B) formas bacilares. (C) Formas cocobacilares. Parte inferior: (D) célula control negativa; (E) y (F), células infectadas. 1000x.

5.1.5 Determinación de la línea celular más susceptible a la infección por *B. henselae* cepa ATCC 49882

Los resultados obtenidos a lo largo de las actividades y pruebas realizadas para demostrar el aislamiento de *B. henselae* cepa ATCC 49882 en las líneas celulares

Vero y Hep-2 empleando el Método de *Shell Vial*, demostraron que dichas células son susceptibles a la infección.

La IFI realizada mostró valores cercanos a 30% de infección en el caso de las células Vero y cercano al 70% en el caso de las células Hep-2 respectivamente (**Tabla 6**). Para ello, se realizó el conteo celular en 10 láminas IFI de 12 pocillos cada uno (total 120 pocillos). En total, 10 pocillos fueron evaluados con suero control negativo y 110 pocillos con suero control positivo (**Figura 33, Tablas 6, 7 y 8**). En la **Tabla 6**, se muestra los resultados del conteo para 10 pocillos representativos y el respectivo porcentaje de infección.

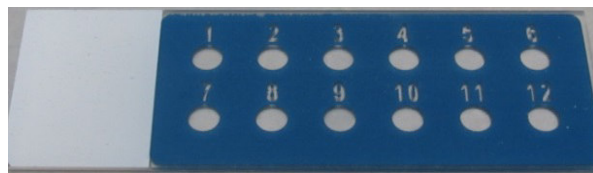


Figura 33. Lámina IFI mostrando pocillos del 1 al 12 con muestras de células inoculadas con *B. henselae* cepa ATCC 49882 (antígeno) evaluadas con sueros control positivo y negativo.

Tabla 6. IFI-Porcentaje de infección por *B. henselae* cepa ATCC 49882 en células

Vero y Hep-2

N° de pocillos (representativos)	Resultados de conteo en 10 pocillos positivos (representativos) evaluados (de un total de 110 pozos)			
	N° de células Vero	N° de células infectadas	N° de células Hep-2	N° de células Infectadas
1	62	18	72	52
2	75	23	59	33
3	51	16	68	47
4	57	17	45	32
5	73	21	63	44
6	68	20	61	42
7	71	21	56	35
8	49	15	60	42
9	75	20	72	49
10	69	21	69	48
Total	650	192	625	424
% de infección	29.5%		67.8%	

Tabla 7. IFI-Resumen global de pocillos evaluados para células vero infectadas con *B. henselae* cepa ATCC (12 días de incubación).

N° de láminas IFI	Total de pocillos evaluados con sueros control positivo y negativo	
	Con suero control positivo (+)	Con suero control negativo (-)
10	110 pocillos	10 pocillos
Resultados globales	Positivos	Negativos

Tabla 8. IFI-Resumen global de pocillos evaluados para células Hep-2 infectadas con *B. henselae* cepa ATCC (12 días de incubación).

N° de láminas IFI	Total de pocillos evaluados con sueros control positivo y negativo	
	Con Suero control Positivo (+)	Pozos con Suero control negativo (-)
10	110 pocillos	10 pocillos
Resultados globales	Positivos	Negativos

5.2 Resultados de la etapa II

Empleando la metodología estandarizada para el aislamiento de *Bartonella henselae* cepa ATCC 49882 en líneas celulares Vero y Hep-2 por el método de *Shell Vial*, se procedió a evaluar las sesenta muestras de sangre total de pacientes procedentes del sistema de vigilancia de febriles, seleccionadas.

Los resultados obtenidos mediante evaluación IFI, coloración Giménez y ECP a los 12 días de incubación fueron de 5 muestras positivas en células Hep-2 y 3 muestras positivas en células Vero, correspondiendo en total a 5 muestras biológicas de 5 pacientes. De éstas 5 muestras positivas en Hep-2, dos de ellas no fueron positivas en células Vero. Estos resultados se pueden observar en las **Figuras 34, 35, 36** y en la **Tabla 9 y 10**.

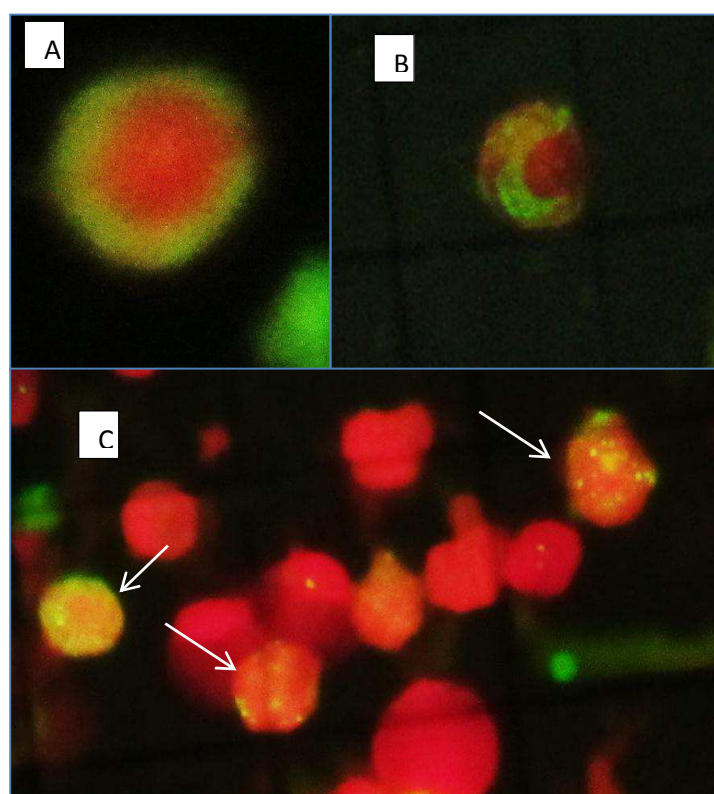


Figura 34. IFI: (A) y (B) células positivas a *Bartonella sp* aislados a partir de muestras de sangre total. (C) células infectadas perdiendo fluorescencia por incidencia de luz fotográfica. 400x

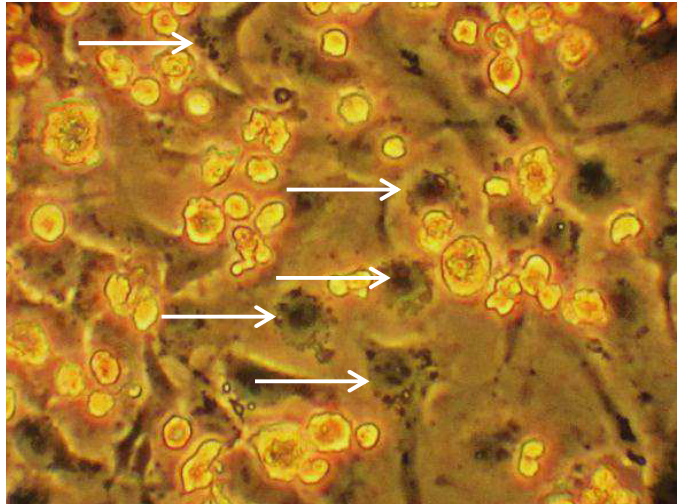


Figura 35. Células Hep-2 mostrando efecto citopático en células infectadas con *Bartonella sp.* Las flechas señalan estructuras pigmentadas cercanas a los núcleos en forma de granulaciones, que corresponderían a invasomas o vacuolas de infección. 400x

Tabla 9. Aislamientos primarios positivos de *Bartonella sp* con la técnica de centrifugación en *Shell Vial* estandarizada en células Vero y Hep-2.

Líneas celulares ATCC	N° positivas	N° negativas	Total de muestras	% DE INFECCIÓN
VERO	3	57	60	8.3%
HEP-2	5	55		

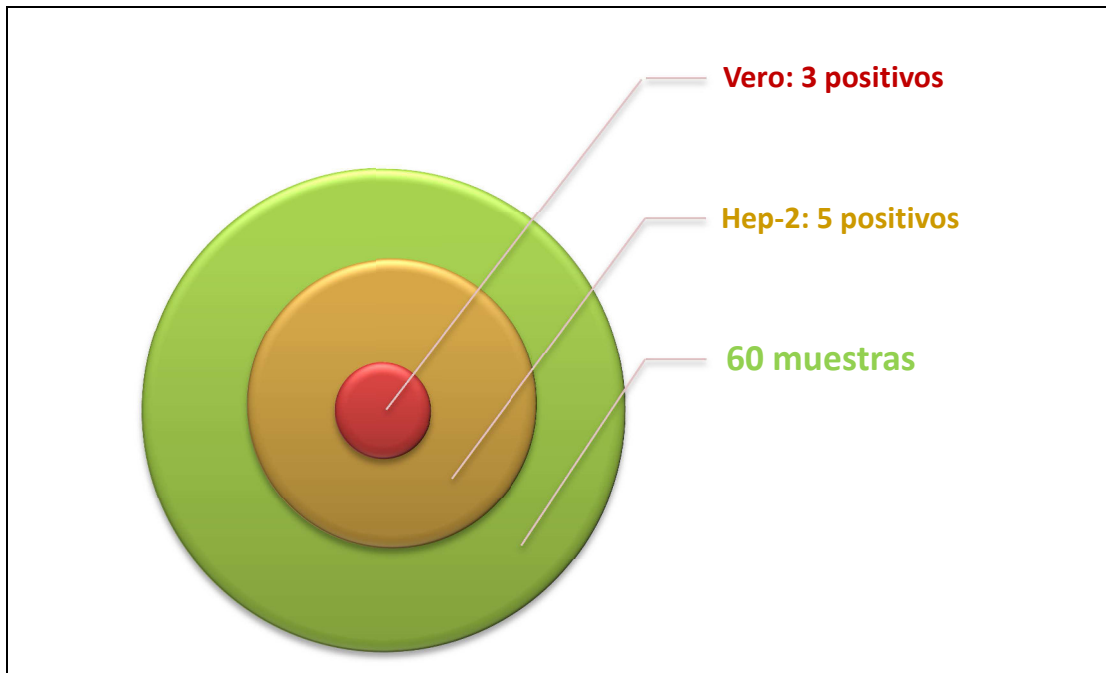


Figura 36. Resumen gráfico de aislamientos positivos primarios: 3 en células Vero y 5 en células Hep-2, de un total de 60 muestras sospechosas de infección por *Bartonella henselae*. De 5 muestras positivas en Hep-2, 2 no fueron positivas en células Vero.

Tabla 10. Aislamiento primario de *Bartonella sp* a partir de 60 muestras de sangre total con sospecha clínica de infección por *Bartonella henselae*

ITEM	COD NETLAB	CULTIVO VERO	IFI VERO	CULTIVO HEP2	IFI HEP2	GIMENEZ	ECP
1	100024510	Negativo	-	Positivo	+++	Positivo	+
2	100024610	Negativo	-	Negativo	-	-	-
3	100025110	Negativo	-	Negativo	-	-	-
4	100025310	Negativo	-	Negativo	-	-	-
5	100025510	Positivo	+	Positivo	+++	Positivo	+
6	100025810	Negativo	-	Negativo	-	-	-
7	20635711	Positivo	+++	Positivo	+++	Positivo	+
8	21539011	Negativo	-	Negativo	-	-	-
9	21818811	Negativo	-	Negativo	-	-	-
10	21983211	Negativo	-	Negativo	-	-	-
11	30036211	Negativo	-	Negativo	-	-	-
12	30719411	Positivo	+	Positivo	++	Positivo	+
13	30719811	Negativo	-	Negativo	-	-	-
14	30720011	Negativo	-	Negativo	-	-	-
15	31676111	Negativo	-	Negativo	-	-	-
16	31864211	Negativo	-	Negativo	-	-	-
17	32040311	Negativo	-	Negativo	-	-	-
18	32188611	Negativo	-	Negativo	-	-	-
19	32188811	Negativo	-	Negativo	-	-	-
20	32189111	Negativo	-	Negativo	-	-	-
21	32189411	Negativo	-	Negativo	-	-	-
22	32189511	Negativo	-	Negativo	-	-	-
23	32189611	Negativo	-	Negativo	-	-	-
24	32189911	Negativo	-	Negativo	-	-	-
25	32190011	Negativo	-	Negativo	-	-	-
26	32190211	Negativo	-	Negativo	-	-	-
27	32190511	Negativo	-	Negativo	-	-	-
28	41006311	Negativo	-	Negativo	-	-	-
29	41006511	Negativo	-	Negativo	-	-	-
30	41006811	Negativo	-	Negativo	-	-	-
31	41028711	Negativo	-	Negativo	-	-	-
32	41028811	Negativo	-	Negativo	-	-	-
33	41243011	Negativo	-	Negativo	-	-	-
34	50187711	Negativo	-	Negativo	-	-	-
35	50191411	Negativo	-	Negativo	-	-	-
36	50516311	Negativo	-	Negativo	-	-	-
37	50516411	Negativo	-	Negativo	-	-	-
38	50730811	Negativo	-	Negativo	-	-	-
39	50739211	Negativo	-	Negativo	-	-	-
40	50750011	Negativo	-	Negativo	-	-	-
41	50888611	Negativo	-	Negativo	-	-	-
42	50888711	Negativo	-	Negativo	-	-	-
43	50888811	Negativo	-	Negativo	-	-	-
44	51085611	Negativo	-	Negativo	-	-	-
45	52727412	Negativo	-	Negativo	-	-	-
46	10904912	Negativo	-	Negativo	-	-	-
47	21316112	Negativo	-	Negativo	-	-	-
48	21316212	Negativo	-	Positivo	++	Positivo	+
49	30041412	Negativo	-	Negativo	-	-	-
50	30107012	Negativo	-	Negativo	-	-	-
51	31973912	Negativo	-	Negativo	-	-	-
52	60157612	Negativo	-	Negativo	-	-	-
53	64141612	Negativo	-	Negativo	-	-	-
54	64141712	Negativo	-	Negativo	-	-	-
55	70231312	Negativo	-	Negativo	-	-	-
56	70236412	Negativo	-	Negativo	-	-	-
57	70254812	Negativo	-	Negativo	-	-	-
58	71237212	Negativo	-	Negativo	-	-	-
59	71256112	Negativo	-	Negativo	-	-	-
60	71256212	Negativo	-	Negativo	-	-	-

6. DISCUSIÓN

La estandarización de la metodología para el aislamiento de *Bartonella henselae* en líneas celulares por el método de *Shell Vial*, es un método optimizado en diversas investigaciones; Gouriet *et al.*, (2005), manifiestan que a diferencia de los métodos de cultivo convencionales, los cultivos celulares son mucho más sensibles y permiten el crecimiento rápido de *Bartonella* spp, permitiendo un diagnóstico oportuno y tratamiento antibiótico temprano (Blanco & Raoult, 2005).

Una observación interesante es la comprobación de que el requerimiento esencial de un factor imprescindible de crecimiento para *Bartonella henselae* en cultivos bacteriológicos enriquecidos como es la hemina, constituye un punto crítico cuando se emplea los cultivos celulares, habiéndose observado desarrollo normal de la cepa. Myers *et al.*, (1969), sugieren a la hemina como precursor de nutrientes esencial para la formación de proteínas antigénicas de la membrana bacteriana ya que pasajes sucesivos de las cepas inhiben la expresión de genes relacionados a expresión de factores de patogenicidad necesarios para conferir a *B. henselae* un fenotipo más invasivo. Por lo mencionado, el aislamiento primario de cepas silvestres a partir de muestras de sangre total es mucho más viable debido a competencias propias del microorganismo en la expresión de la adhesina A de *Bartonella henselae* BadA, indispensables para la adhesión a la célula hospedera, como también para la autoaglutinación y para la formación de invasomas de infección (Batterman *et al.*, 1995; Lynch *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos en las pruebas de coloración Giménez e IFI fueron negativos para los cultivos celulares inoculados con *B. henselae* cepa ATCC 49882 sin el suplemento hemina. Esto sugiere el rol importante de ciertos componentes sanguíneos en la recuperación de un fenotipo invasivo perdido en pasajes consecutivos de la cepa ATCC.

Las pruebas de coloración Giménez a partir de cultivos Vero y Hep-2 infectados con *B. henselae* cepa ATCC 49882, mostraron escasas formas bacilares aisladas, predominando las formas autoaglutinadas en invasomas o vaculas de infección (Batterman *et al.*, 1995; Dehio *et al.*, 2008; Lynch *et al.*, 2011); así mismo, la coloración Giménez para discriminar el aislamiento primario a partir de sangre total, mostró estructuras densas y pigmentadas correspondientes a dichas estructuras. El efecto citopático (ECP) de las células infectadas con la cepa patrón observadas al microscopio invertido, es un parámetro importante que tuvo concordancia total con las lecturas al microscopio de inmunofluorescencia indirecta tal como es descrito por Rhomberg (2007).

Igualmente importante para la calidad de los cultivos y logros exitosos en el aislamiento primario, fueron las características particulares presentadas por las 60 muestras de sangre total, como son, la densidad, contenido graso, probables contaminantes y el deterioro por tiempo transcurrido desde la toma de muestra, generando dificultad en la observación del efecto citopático en los cultivos, requiriéndose experticia para no confundirlo con efectos citotóxicos. Asimismo, las lecturas de coloración Giménez e inmunofluorescencia, constituyen procedimientos controlados a ser realizados por personal rigurosamente experimentado capaz de distinguir lo específico de lo inespecífico (Koneman & Allen, 2008).

El tiempo de centrifugación de los *Shell vial* descrito por Gouriet *et al.*, (2005), fue optimizado a 700g x 15 minutos debido a que tiempos mayores de centrifugación en condiciones experimentales del laboratorio, según se pudo observar, generaron desprendimiento de la monocapa celular en áreas cercanas al perímetro de la base del *Shell Vial*.

Las diferencias de la susceptibilidad a la infección de células Vero y Hep-2 tanto por cepa patrón como por *Bartonella sp.* en el aislamiento primario, es probablemente

atribuible a características propias de cada línea celular para la expresión de determinadas proteínas específicas, obedeciendo al estímulo de determinados parámetros como es la temperatura, suplementos nutritivos, concentración de CO₂, etc. Una publicación reciente señala que el crecimiento de *Bartonella henselae* en células Vero es favorecido por parámetros diferentes a los empleados en este estudio, a saber, la incubación a 35°C y con medio Schneider (Lynch *et al.*, 2011).

La inmunofluorescencia indirecta es la prueba de oro que permite visualizar todos los puntos de adherencia e infección intracelular tanto por la cepa ATCC como por *Bartonella sp.* en células Vero y Hep-2, mediante el empleo de anticuerpos específicos. De un total de 60 muestras de sangre total procesadas, se obtuvo el 8.3% de aislamientos positivos evaluados por IFI, los que concordaron con la coloración Giménez y la evaluación del efecto citopático.

Estudios realizados por Rhomberg (2007) en HUVEC, señalan que la formación de vacuolas de infección tarda entre 24 y 48 horas; sin embargo, en las condiciones experimentales del laboratorio Metaxénicas Bacterianas del INS-CNSP, con los parámetros empleados para el aislamiento en líneas celulares Vero y Hep-2, el tiempo fue de 7 días con baja incidencia de infección, alcanzando el mayor pico de forma gradual desde los 9 hasta los 12 días, permitiendo visualizar microorganismos intracelulares mediante las pruebas ensayadas.

Batterman (1995), indica la formación de agregados bacterianos en la superficie de la célula hospedera para la formación de vacuolas de infección a las 2 horas después de la centrifugación. Sin embargo, es necesario mencionar que nuestro interés fue obtener únicamente el aislamiento de microorganismos intracelulares que mediante IFI permitiera lecturas positivas, además del ECP en observaciones en el microscopio invertido.

7. CONCLUSIONES

Es factible aislar *Bartonella henselae* cepa ATCC 49882 en líneas celulares continuas por el método de centrifugación en *Shell Vial* en células Vero ATCC y Hep-2 ATCC.

La hemina es un factor sanguíneo esencial necesario para la infección de las líneas celulares por *Bartonella henselae* cepa ATCC 49882, mas no para el aislamiento primario de cepas silvestres.

El tiempo óptimo de incubación de los cultivos celulares Vero y Hep-2 inoculados con *Bartonella henselae* cepa ATCC 49882, fue determinado en un periodo corto de 9 a 12 días, siendo Hep-2 la línea celular más sensible.

La coloración de Giménez optimizada permitió observar estructuras denominadas invasomas de infección intracelulares en células Vero y Hep-2, siendo muy escasa la observación de formas bacterianas aisladas.

La cantidad óptima de sobrenadante de sangre total lisada por choque térmico para la inoculación en cultivos celulares Vero y Hep-2 es de 20 µl por 1 ml de medio de mantenimiento para el aislamiento primario de *Bartonella henselae*; concentraciones mayores de sangre total tuvieron efecto citotóxico observándose desprendimiento de la monocapa celular.

El aislamiento primario de *Bartonella henselae* a partir de sangre total en cultivos celulares por el método de centrifugación en *Shell Vial* se realizó con resultados satisfactorios.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios de aislamiento de *Bartonella henselae* en líneas celulares continuas diferentes a las empleadas en el presente estudio, como son, ECV 304 y Hela, ya que la literatura (Koneman, 2006) refiere aislamientos exitosos en dichas líneas continuas.

Realizar un estudio comparativo con la coloración Warthin Starry en forma paralela a coloración Giménez con el objetivo de discriminar mejor a las bacterias y no confundirlas con estructuras celulares.

Usar cepas patrón de *B. henselae*, *B. quintana* y *B. bacilliformis* en forma paralela para la preparación de antígenos para la prueba de inmunofluorescencia indirecta en los aislamientos primarios de *Bartonella sp.* con fines de discriminar la reacción cruzada.

Emplear en forma paralela el medio de mantenimiento EMEM 10% SBF, medio Scheider, y medio RPMI 1640, además de ensayar 2 temperaturas diferentes de incubación: 35°C y 37°C para fines comparativos de sensibilidad.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abarca, K; Winter, M; Marsac, D; Palma, C; Contreras, A; *et al.*, (2013). Exactitud y utilidad diagnóstica de la IgM en infección *por Bartonella henselae*. Investigación Clínica. Pontificia Universidad de Chile, Santiago. Escuela de Medicina. Pág. 125-128.

Abarca, K; Vial, P; García, C; Oddó, D; Prado, P. (1996). Infección por *Bartonella henselae* en pacientes inmunocompetentes: enfermedad por arañazo de gato. Revista Médica de Chile; 124: 1341-9.

Álvarez, I; Ponce, J; Silva, R. (2003). Enfermedad por arañazo de gato. Presentación de un caso. Revista Cubana de Pediatría. 75(4).

Anda, P; Blanco, JR; Jado, I; Marín, M; Oteo, JA; *et al.*, (2007). Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones por Patógenos Bacterianos Emergentes: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia*; *Tropheryma whipplei*. 27 (2): 7-10.

Angelakis, E; Billeter, S; Breitschwert, E; Chomel, B; Raoult, D. (2010). Potential for Tick-borne Bartonellosis. Emerging Infectious Diseases. Vol 16 (3): 385-391.

Bergmans, A; Schellenkens, J; Embden, J; Schouls, L. (1996). Predominance of Two *Bartonella henselae* Variants among Cat-Scratch Disease Patients in The Netherlands. Journal of Clinical Microbiology; 34 (2): 254-260.

Arias-Stella, J; Bravo-Puccio, F; Arias-Stella, C. (1996). Angiomatosis Bacilar en el Perú: Una nueva forma de Bartonelosis que es necesario diferenciar de la Verruga Peruana. *Folia Dermatológica Peruana*; 7(2):31-36.

Asencio-Sanchez, V; Rodriguez-Delgado, B; García-Herrero, E; Cabo-Vaquera, V; García-Loygorri, C. (2006). Desprendimiento Seroso de Mácula como Manifestación Atípica de la Enfermedad del Arañazo del Gato. *Arch Soc Esp Oftalmol*; 81: 717-720.

Batterman, H; Peek, j; Loutit, j; Falkou, S; Tompkins, S. (1995). *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* Adherence to and Entry into Culture Human Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 63(11), 4553 – 4556.

Bergmans, A; Peeters, J; Schellekens, J; Vos, M; Sabbe, L; *et al.*, (1997). Pitfalls and fallacies of Cat Scratch Disease serology: Evaluation of *Bartonella henselae*-Based Indirect Fluorescence Assay and Enzyme-Linked Immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*; 35(8):1931-1937.

Birtles, R; Harrison, T; Saunders, N; and Molyneux, D. (1995). Proposals to Unify the Genera *Grahamella*, with Descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and Three New Species, *Bartonella grahamii* sp.nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp.nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 45(1): 1-8.

Blanco, JR & Raoult D. (2005). Enfermedades Producidas por *Bartonella spp.* *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*; 23(5): 313-320.

Brenner, D; Steven, P; O'Connor, S; Herbert, H; Winkler, H; *et al.*, (1993). Proposals to Unify the Genera *Bartonella* and *Rochalimae*, with descriptions of *Bartonella quintana*

comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. Nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb.nov. and To Remove the Family *Bartonellaceae* from the order *Rickettsiales*. International Journal of Systematic Bacteriology. 43(4): 777-786.

Buelvas, F; Alvis, N, Buelvas, I; Miranda, J; Mattar, S. (2008). Alta Prevalencia de Anticuerpos contra *Bartonella* y *Babesia microti* en Poblaciones Rurales y Urbanas en dos Provincias de Córdoba, Colombia. Rev. Salud Pública. 10 (1):168-177.

Cané, A. (2009). Enfermedad por arañazo de gato en pediatría. La Gaceta de Infectología y Microbiología Clínica; 3(4):1-8.

CFSPH: The Center for Food Security and Public Health-Institute for International Cooperation in Animal Biologics. Enfermedad por arañazo de gato y otras infecciones por *Bartonella henselae*. Iowa State University. College of Veterinary medicine (2005):1-6.

Chang, Ch; Chomel, B; Wasten, R; Tappero, J; Sanchez, M; *et al.*, (2002). Molecular Epidemiology of *Bartonella henselae* Infection in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients and Their Cat Contacts, Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Genotyping. The Journal of Infectious Disease Society of America. 186:1733-1739.

Chomel, B; Boulois, H; Maruyama, S; Bretischwerdt, E. (2006). *Bartonella* spp in pets and effect on human health. Emerging Infectious Disease; 12(3): 389–394.

Chomel, B; Kasten, R; Floyd-Haukins, K; *et al.*, (1996). Experimental transmission off *Bartonella henselae* by the cat flea. Journal Clinical of Microbiology; 34(8): 1952-1956.

Clarridge, J; Raich, T; Prwani, D; Simon; Tsai, L; *et al.*, (1995). Strategy to Detect and Identify *Bartonella* Species in Routine Clinical Laboratory Yields *Bartonella henselae*

from Human Immunodeficiency Virus-Positive Patient and Unique *Bartonella* Strain from His Cat. Journal of Clinical Microbiology; 33 (8): 2107-2113.

Cornejo, W. y Vizcarra, H. (1999). *Bartonella henselae*: Nuevo Patógeno en Humanos. Anales de la Facultad de Medicina; 60(4): 281-292.

Cotté, V; Bonnet, S; Le Run, D; Le Naour, E; Chauvin, A; *et al.*, (2008). Transsmision of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. Emerging Infectious Diseases; 14 (7): 1074-1080.

Crespo, MP (2000). El Diagnóstico viral por el laboratorio. Colombia Médica; 31 (3200): 135-150.

Dehio, C. (2008). Infection-associated type IV secretion systems of *Bartonella* and their diverse roles in host cell interaction. Cellular Microbiology; 10(8): 1591-1598.

Dehio, C. (2005). *Bartonella*-host-cell interactions and vascular tumour formation. Nature Reviews. Microbiology; 3: 621-631.

Dehio, C. (2004). Molecular and cellular basis of *Bartonella* pathogenesis. Annual Review of Microbiology; 58: 365-390.

Dehio,C (1997). Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. Journal of Cell Science 110, 2141-2154.

Del Valle, L; Macías, C; Torres, I; Marsán, V; SOcarrás, B; *et al.* (2002). Efecto in vitro de la Hemina sobre la proliferación de los linfocitos humanos. Revista Cubana de Hematología; 18(2).

Drancourt, M; Mainardi, JL; Brouqui, P; Vandenesch, F; Carta, A; *et al.*, (1995). *Bartonella (Rochalimaea) quintana* endocarditis in three homeless men; The New England Journal of Medicine; 332(7): 419-423.

Ferrés, M; Abarca, K; Prado, P; Montecinos, L; Navarrete, M; *et al.*, (2006). Prevalencia de anticuerpos contra *Bartonella henselae* en niños, en adolescentes y en una población de riesgo ocupacional en Chile. Rev Méd Chile; 134: 863-867.

Florín, T; Zaoutis, T; Zaoutis, L. (2008). Beyond Cat Scratch Disease: Widening Spectrum of *Bartonella henselae* Infection. Official Journal of the American Academy of Pediatrics. Divisions of a General Pediatrics and Infectious Diseases, Children's Hospital of Philadelphia, Pennsylvania; Departments of Pediatrics and Epidemiology; 121: e1412-e1426.

Franz, B. y Kempf, V. (2011). Adhesion and host modulation: critical pathogenicity determinants of *Bartonella henselae*. Biomed Central; Parasites and Vectors; 54 (4):1-5.

García, I; Marín, M; Castellano, V; Rodríguez, A. (2009). Fiebre, linfadenopatías y *Bartonella henselae*. Casos de Microbiología Clínica; Caso Nº 439, 1-3.

Garrity, J; Brenner, J; Krieg, N; Staley, J. (2001). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition. (2): 362-373

Gerrikagoitia, X. (2010). Los carnívoros silvestres como reservorios de enfermedades de interés en sanidad animal y salud pública. Universidad Del País Vasco. Tesis doctoral N° 69:70-73.

Giménez, DF. (1964). Staining *Rickettsiae* In Yolk-Sac Cultures. Stain Technol; 39:135-140.

Gonçalves da Costa, P; Brigatte, M; Greco, D. (2005). Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana* and *Ehrlichia chaffensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil. *Mem inst Oswaldo Cruz*, 100(8): 853 – 859.

Gouriet, F; Fenollar, F; Patrice, JY; Drancourt, M; Raoult, D. (2005). Use of shell vial cell culture assay for isolation of bacteria from clinical specimens: 13 year of experience. *Journal of Clinical Microbiology*; 43(10), 4993 – 5002.

Higgins, R. (2004). Emerging or re-emerging bacterial zoonotic diseases: bartonellosis, leptospirosis, Lyme borreliosis, plague. *Review sci. tech*; 23(2): 569-581.

Huarcaya, E; Infante, B; Maguiña, C; Merello, J; Birtles, R; et al; (2003). Identificación de *Bartonella sp.* mediante reacción en cadena de la polimerasa y métodos microbiológicos. *Rev. Diagnóstico*; 42(3):151-153.

Huarcaya, E; Ventosilla, P; Maguiña, C; Merello, J; Infante, B; et al., (2001). Primer reporte de *B. henselae* y *B. clarridgeiae* en pacientes por Enfermedad de Arañazo de Gato y Angiomatosis bacilar en Lima-Perú. *Rev. Diagnóstico*; 40(1):13-19.

Hudson, J; Misra, V; Mosmann, T. (1976). Cytomegalovirus infectivity: analysis of the phenomenon of centrifugal enhancement of infectivity. *Virology*. 72 (1): 235-243.

IICAB: Institute For International Cooperation In Animal. Biologics (2005). Enfermedad por arañazo de gato y otras infecciones por *Bartonella henselae*. Iowa State University College of Veterinary Medicine.1-6

Jackson, L; Perkins, B; Wenger, J. (1993). Catch Scratch Disease in the United States: An analysis of three national Databases. *American Journal Public Health*. 83(12): 1707-1711.

Kaiser, P; Linke, D; Linke, D; Schwarz, H; *et al.*, V. (2012). Analysis of the BadA stalk from *Bartonella henselae* reveals domain-specific and domain-overlapping functions in the host cell infection process. *Cellular Microbiology*. 14 (2): 198-209.

Kaiser, P; Riess, T; O'Rourke,F; Linke, D; Kempf, V. (2011). *Bartonella* spp.: Throwing light on uncommon human infections. *International Journal of Medical Microbiology*; 301(1): 7-15.

Kitchel, B; Fan ,T; Kordick, D; Breitschwerdt, E; Wollenberg, G; *et al.*, (2000). Peliosis Hepatis in a Dog Infected with *Bartonella henselae*. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 216(4): 519-523, 517.

Koehler, J; Sanchez, M; Garrido, C; Whitfeld, M; Chen, F; *et al.*, (1997). Molecular Epidemiology of *Bartonella* Infections in Patients whit Bacillary Angiomatosis-Peliosis.The New England Journal of Medicine; 337(26): 1876-83.

Koneman, E. & Allen S. Diagnóstico Microbiológico (2008). Especies de *Bartonella*. Editorial Médica Panamericana. Sexta Edición. Cap. 9: 474-487.

La Scola, B. y Raoult, D. (1999). Culture of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* from human samples: a 5 year experience (1993 – 1998). Journal of Clinical Microbiology, 37(6): 1899 – 1905.

Ladrón de Guevara, D; Lobos,G; Miranda, M; Wu, E; Muñoz, A; *et al.*, (2003). Forma atípica de enfermedad por arañazo de gato: Compromiso óseo en dos pacientes pediátricos detectado mediante cintigrafía ósea. Revisión de la literatura. Revista Chilena de Infectología; 20, (3): 202-209.

Laerte, V; Land, A; Da Silva, A; Portela, S; Benamor, M; *et al.*, (2008). Cat Scratch Disease Complicated With Aseptic Meningitis and Neuroretinitis. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 12 (2): 158-160.

Lamas, C; Mares-Guia, MA; Rozental, T; *et al.*, (2010). *Bartonella spp.* infections in HIV positive individuals,their pets and ectoparasites in Rio de Janeiro, Brazil: Serological and molecular study. Acta Trópica, 115(1-2): 137-141.

Lamas, C; Curi, A; Bóia, MN; Lemos, E. (2008). Human *Bartonellosis*: seroepidemiological and clinical features with an emphasis on data from Brazil – A Review. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; 103(3): 221 – 235.

Lynch, T; Iverson, J; Kosoy, M. (2011). Combining Culture Techniques for *Bartonella*: the Best of Both Worlds. Journal Clinical Microbiology. 49(4):1363-1368.

Maguiña, C. (2001). Las viejas y nuevas *Bartonellas*: una enfermedad emergente mundial. Acta Medica Peruana; 18 (3): 122-32.

Marrero, M & Raoult, D. (1989). Centrifugation-Shell Vial technique for Rapid Detection of Mediterranean Spotted Fever *Rickettsia* in Blood Cultura. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene; 40: 197-199.

Maurin, M. & Raoult, D. (1998). *Bartonella* infections: diagnostic and management issues. Curr Opin Infect Dis; 11(2): 189-193.

Maurin, M; Roux, V; Stein, A; Ferrier, F; Viraben, R; *et al.*, (1994). Isolation and Characterization by Immunofluorescence, Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Western Blot, Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR, 16S rRNA Gene Sequencing, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *Rochalimaea quintana* from a Patient with Bacillary Angiomatosis; 32 (5): 166-171.

McMullen, L; Walker, M; Bain, L; Karim, Q; Baron, J. (1986). Histological Identification of *Campylobacter* using Gimenez technique in gastric antral mucosa. Journal of Clinical Pathology. 40(4); p. 464-465.

Müller, N; Kaiser, P; Linke, D; Schuarz, H; Riess, T; *et al.*, (2011). Trimeric Autotransporter Adhesin-Dependent Adherence of *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Yersinia enterocolitica* to Matrix Components and Endothelial Cells under Static and Dynamic Flow Conditions. Infection and immunity. 79(7): 2544-2553.

MINSA-INS (2006): Ministerio de Salud-Instituto Nacional de Salud, Diagnóstico Bacteriológico De la Bartonelosis Humana O Enfermedad de Carrión. Sección 2-5: 9-48.

MINSa-INS (2003). Ministerio de salud, Norma Técnica Para el Diagnóstico y Atención Curativa de la Bartonelosis O Enfermedad de Carrión en el Perú. NT Nº 001- MINSa / DGSP-V.01

MINSa-INS (2002). Ministerio de Salud-Instituto Nacional de Salud, Manual de Procedimientos de Obtención de Muestras Para el Diagnóstico Bacteriológico en Infecciones Intrahospitalarias. Sección 3, 1-9.

Myers, W; Utler, L and Wisseman, Ch. (1969). Role of Erythrocytes and Serum in the Nutrition of *Rickettsia quintana*. Journal of Bacteriology. USA; 97(2): 663-666.

Navarrete, M; Täger, M; Wenzel, A; Podestá, L; Pincheira, M; *et al.*, (2003). Formas atípicas de enfermedad por arañazo de gato. Caso clínico. Revista Chilena de Infectología; 20 (4): 257-261.

O'Rourke *et al.*, (2011). Editors: Linke, D. & Goldman, A. Bacterial adhesion. Chemistry, Biology and Physics. Editorial Springer. 715: 51-66.

Pachas, P. (2000). Epidemiología de la Bartonelosis en el Perú. Epidemiología de las bartonelosis en el Perú. Oficina General de Epidemiología del Instituto Nacional de Salud. Pag. 12.

Picazo, j; García, JA; Canton, R; García, JE; Gómez, L; *et al.*, (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas Y Microbiología clínica. Métodos Básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. 11: 6.

Polanco, P; Cornejo, M; Zapata, E; Calderón, V; Márquez, P; *et. Al.* (2008). Primer reporte de enfermedad sistémica por arañazo de gato (*Bartonella henselae*) en el Perú. Acta Medica Peruana; 25(4): 228-231.

Raoult, D; Birtles, RJ; Montoya, M; Perez, E; Tissot-Dupont, H; *et al.*, (1999). Survey of three bacterial louse-associated diseases among rural Andean communities in Peru: prevalence of epidemic typhus, trench fever, and relapsing fever. Clinical Infection Diseases; 29:434-436.

Regnery, RL; Olson, JG; Perkins, BA; Bibb, W; (1992). Serological response to "*Rochalimaea henselae*" antigen in suspected cat-scratch disease. Lancet; 339: 1443-45.

Rhomberg, Tomas A. (2007). "Molecular and Cellular Basis of the Internalization of *Bartonella henselae* by Human Endothelial Cells". Aprobado a petición de Prof. Dr. Christoph Dehio, Prof. Dr. Guy R. Cornelis, Prof. Dr. Michael N. Hall. Tesis doctoral de la facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Basel.

Rodriguez, G; Torres, B; Motta, A. (2002). Angiomatosis Bacilar. Presentación de casos. Bogotá D.C. Colombia. 141-154.

Schaller, J; Burkland, G; Langhoff, P. (2007). Do *Bartonella* Infections cause Agitation, Panic Disorder, and Treatment-Resistant Depression?. 9(3):54.

Scheidegger, F. (2009). The Role of the VirB/VirD4/Bep System in *Bartonella henselae*-triggered Vascular Proliferation. Tesis para obtener el grado de Doctor en la Facultad de Filosofía-Ciencias Naturales de la Universidad de Basel. Pag: A16-A20.

Schwartzman; W, Nesbit C; Baron, E. (1993). Development and Evaluation of a Blood-Free Medium for Determining Growth Curves and Optimizing Growth of *Rochalimaea henselae*. Journal Clinical of Microbiology; 31 (7): 1882-1885

Statsny, J; Wakely, P. Jr; Frable, W. (1996). Cytologic features of necrotizing granulomatous inflammation consistent with cat-scratch disease. Diagn Cytopathol; 15: 108-115.

Tappero, J; Mohle-Boetani, L; Koehler, J; Waminathan, B; Berger, TG; *et al.*, (1993a). The epidemiology of Bacillary Angiomatosis and Bacillary Peliosis. Journal American Medical Association; 269 (6):770-775.

Tappero, J; Koehler, J; Berger, T. (1993b). Bacillary angiomatosis and bacillary splenitis in immunocompetent adults. Ann Intern; 118: 363-5.

Torres, R; Mezzarina, J; Candela, J; Bravo, F; Fuertes, M; *et al.*, (2003). Reporte de un caso de angiomatosis bacilar en un niño con infección por VIH. Folia Dermatológica Peruana; 14 (3): 26-30.

Vásquez, P; Chanqueo, L; Garcia, P; Poggi, H; Ferrés, M; *et al.*, (2007). Angimatosi bacilar por *Bartonella quintana* en un paciente por infección con virus de inmunodeficiencia humana. Revista Chilena de Infectología; 24(2): 155-159.

Villaseca, P. Padilla, C; Ventura, G; Samalvides, F; Yañez, H; *et al.*, (1999). Importancia de la *Lutzomyia peruensis* en la transmisión de la enfermedad de Carrión en el Valle Sagrado de los Incas. Urubamba-Cuzco, Perú. Revista Medica Experimental; 15 (1-2): 28-30

Wear, D; Margileth, T; Hadfield, G; Fischer, C; Schlagel; *et al.*, (1983). Cat scratch disease: a bacterial infection. *Science*; 221(4618): 1403-1405.

Zangwill, K; Hamilton, D; Perkins, B; Regnery, R; Plikaytis, B; *et al.*, (1993). Cat Scratch Disease in Connecticut Epidemiology, Risk Factors and Evaluation of a New Diagnostic Test. *The New England Journal of Medicine*; 329(1): 8-13.

Zaror, L; Erns, S; Navarrete, M; Ballesteros, A; Boroscheck, D; *et al.*, (2002). Detección serológica de *Bartonella henselae* en gatos y sus propietarios en la ciudad de Valdivia, Chile. *Arch. Med. Vet.* 34(1); 103-110.

Zeaiter, Z; Fournier, PE; Raoult, D. (2002). Genomic Variation of Bartonella henselae Strains Detected in Lymph Nodes of Patients with Cat Scratch Disease. Journal Of Clinical Microbiology. 40 (3): 1023-1030.

10. ANEXOS


Anexo 1. Catálogo de *Bartonella henselae* cepa ATCC 49882




Product Sheet

Bartonella henselae (ATCC® 49882™)

Please read this FIRST



Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section



Biosafety Level
2

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Bartonella henselae* (ATCC® 49882™)



Description

Designation: Houston-1 [CIP 103737, G5436]

Deposited Name: *Rochalimaea henselae* Regnery et al.

Product Description: Type strain. Genome sequencing strain.



Propagation

Medium

ATCC® Medium 18: Trypticase Soy Agar/Broth

ATCC® Medium 260: Trypticase soy agar/broth with defibrinated sheep blood

Growth Conditions

Temperature: 37°C

Atmosphere: 5% CO₂

Propagation Procedure

1. Open vial according to enclosed instructions.
2. Using a single tube of #18 broth (5 to 6 mL), withdraw approximately 0.5 to 1.0 mL with a Pasteur or 1.0 mL pipette. Rehydrate the entire pellet.
3. To obtain a biphasic culture, add 0.4 mL of the suspension to a #260 slant. Add remaining 0.1 mL of the suspension to a #260 plate and streak for isolation.
4. Incubate the tubes and plate at 37°C under 5% CO₂. Incubate slant with cap loose.
5. Within 5 to 10 days of incubation, good growth should be obtained in the broth pool at the bottom of the slant. Further subcultures can be made using the broth pool as the inoculum source. Colony formation may take longer and presents as circular, entire, glistening, convex and pin-point.



Notes

This is a slow-growing organism that requires moist conditions for best growth. Growth at the broth/agar interface of the biphasic slant should occur within 5 to 10 days.

The use of fresh media is of primary importance.

ATCC® Medium #4 (Tryptic Soy Agar with 5% Defibrinated Rabbit Blood) may also be used.

Once good growth is obtained, transfer or freeze the culture. Adding an equal amount of 20% sterile glycerol to pooled broth from several biphasic slants, followed by freezing in liquid nitrogen or "ultra-low temperature" freezer, is recommended.

Purified genomic DNA of this strain is available as ATCC® 49882D-5™.

Additional information on this culture is available on the ATCC® web site at www.atcc.org.



References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.



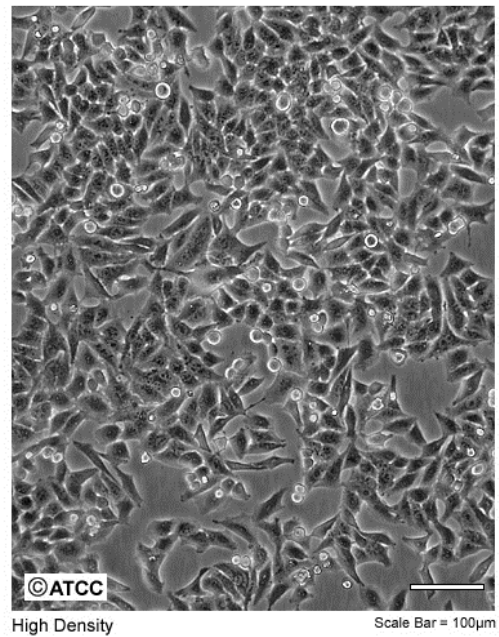
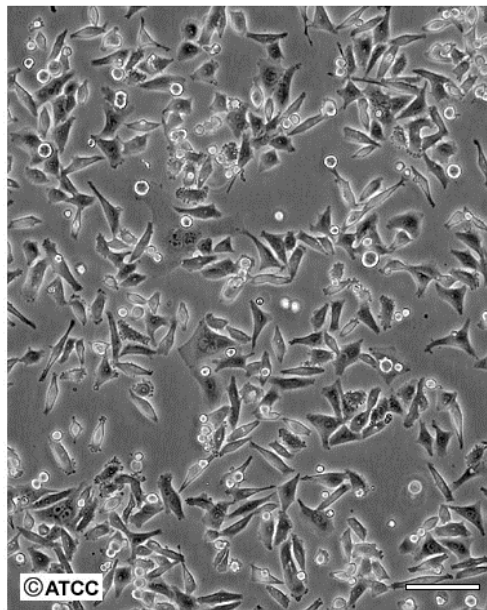
Biosafety Level: 2

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

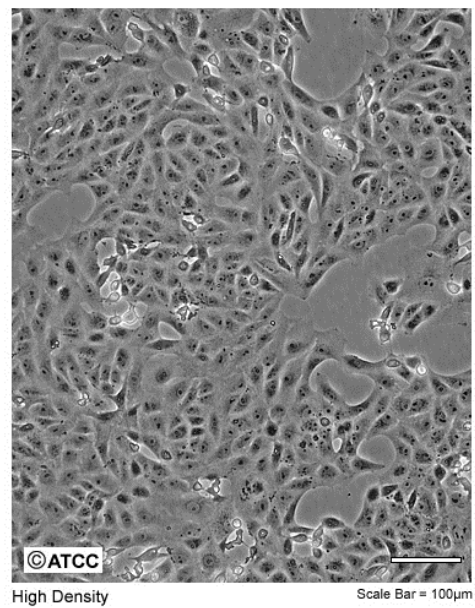
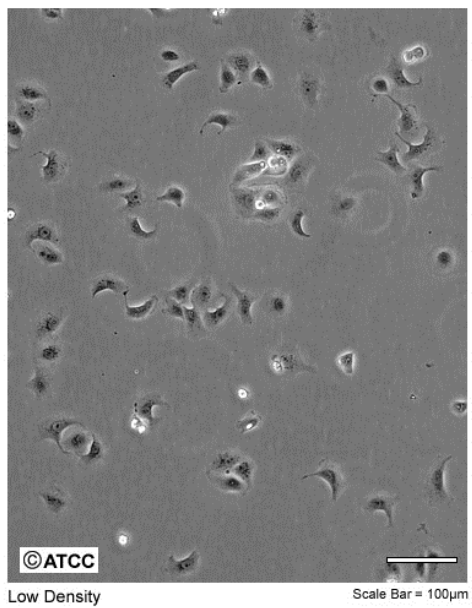
ATCC Warranty

Anexo 2. Catálogo Hep-2 ATCC y Vero ATCC

ATCC Number: **CCL-23**
Designation: **HEp-2**



ATCC Number: **CCL-81**
Designation: **Vero**



Anexo 3. MEDIOS DE CULTIVO

A. Medio de crecimiento celular:

1. Verter 9.53 g de EMEM en 900 ml de agua bidestilada o agua ultra pura y agitar hasta que se disuelva.
2. Agregar los siguientes componentes suplementarios:
 - Aminoácidos no esenciales 10 ml
 - NaHCO_3 10 ml
 - Hepes buffer 10 ml
 - Piruvato de sodio 10 ml
 - Suero bovino fetal 100 ml
 - Antibiótico-antimicótico 2 ml
3. Ajustar el pH a 7.2 y filtrar.
4. Controlar el medio en incubación a 37°C por 48 horas.
5. Conservar a 4°C por 02 meses como máximo.

B. Medio de mantenimiento celular:

1. Verter 9.53 g de EMEM en 950 ml de agua bidestilada o agua ultra pura y agitar hasta que se disuelva.
2. Agregar los siguientes componentes suplementarios:
 - Aminoácidos no esenciales 10 ml
 - NaHCO_3 10 ml
 - Hepes buffer 10 ml
 - Piruvato de sodio 10 ml
 - Suero bovino fetal 50 ml
3. Ajustar el pH a 7.2 y filtrar.

4. Controlar el medio en incubación a 37°C por 48 horas.
5. Conservar a 4°C por 02 meses como máximo.

C. Agar Columbia con 10% de sangre de carnero desfibrinada

- Fórmula por litro de agua bidestilada
- Digerido pancreático de caseína 12.0 g
- Digerido péptico de tejido animal 5.0 g
- Extracto de levadura 3.0 g
- Extracto de carne bovina 3.0 g
- Almidón de maíz 1.0 g
- Cloruro sódico 5.0 g
- Agar 13.5 g
- Sangre de carnero desfibrinada
- pH $7.3 \pm 0,2$

Anexo 4. SOLUCIONES

A. Coloración o tinción de Giménez (Giménez, 1964)

1. Cubrir con solución de Carbol-fucsina durante 2 minutos
2. Lavar con agua del grifo
3. Cubrir con verde de malaquita durante 15-20 segundos
4. Lavar con agua del grifo
5. Cubrir con verde de malaquita durante 15-20 segundos
6. Lavar con agua del grifo
7. Dejar secar al aire

(Utilizar la carbol-fucsina recién preparada de tampón y solución base y filtrada.
Estable por 48 horas)

B. Solución Fosfato Salina (PBS 1X)

1. Realizar la mezcla de los siguientes componentes:
 - Na Cl 8.0 g
 - KCl 0.2 g
 - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot (\text{anhidro})$ 1.15 g
 - $\text{K H}_2\text{PO}_4$
 - Agua bidestilada o ultrapura 1000 ml
2. Ajustar el pH a 7.2 y filtrar.
3. Controlar la solución en la incubadora a 37°C por 48 horas.
4. Conservar la solución a 4°C

C. Solución Tripsina-EDTA 1X

1. Realizar la mezcla de los siguientes componentes:
 - PBS pH 7.2: 90 ml
 - Solución 0.5% Tripsina-EDTA 10X: 10 ml
2. Filtrar con el sistema completo de filtración en cabina de bioseguridad.
3. Congelar a -20°C por un máximo de 02 años.